

Projet ANR-07-GPLA-017

GENESALB

Programme GENOPLANTE 2010



A	IDENTIFICATION	2
B	RESUME CONSOLIDE PUBLIC	2
B.1	Instructions pour les résumés consolidés publics	Erreur ! Signet non défini.
B.2	Résumé consolidé public en français.....	2
B.3	Résumé consolidé public en anglais.....	4
C	MEMOIRE SCIENTIFIQUE	5
C.1	Résumé du mémoire	6
C.2	Enjeux et problématique, état de l'art	6
C.3	Approche scientifique et technique	7
C.4	Résultats obtenus.....	9
C.5	Exploitation des résultats.....	11
C.6	Discussion	11
C.7	Conclusions	12
C.8	Références	13
D	LISTE DES LIVRABLES	13
E	IMPACT DU PROJET	14
E.1	Indicateurs d'impact	14
E.2	Liste des publications et communications	15
E.3	Liste des éléments de valorisation.....	17
E.4	Bilan et suivi des personnels recrutés en CDD (hors stagiaires)	18

A IDENTIFICATION

Acronyme du projet	GENESALB
Titre du projet	Genetic analysis of resistance to South American Leaf Blight (SALB) in rubber tree (<i>Hevea</i> spp.)
Coordinateur du projet (société/organisme)	CIRAD
Période du projet (date de début – date de fin)	01/01/08 – 31/12/10
Site web du projet, le cas échéant	

Rédacteur de ce rapport	
Civilité, prénom, nom	Dr Marc Seguin
Téléphone	04 67 61 71 27
Adresse électronique	marc.seguin@cirad.fr
Date de rédaction	

Si différent du rédacteur, indiquer un contact pour le projet	
Civilité, prénom, nom	
Téléphone	
Adresse électronique	

Liste des partenaires présents à la fin du projet (société/organisme et responsable scientifique)	Cirad, Michelin, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC, Bahia, Brésil)
---	--

B RESUME CONSOLIDE PUBLIC

B.1 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN FRANÇAIS

Génétique et génomique de la résistance de l'hévéa à un champignon dévastateur

Valorisation des ressources génétiques de l'hévéa pour lutter contre la maladie qui menace la production de caoutchouc naturel

La maladie sud-américaine des feuilles (SALB), due au champignon *Microcyclus ulei*, fait peser une menace réelle sur l'approvisionnement mondial en caoutchouc naturel (consommation de 10 Mt/a). Cette production est en effet assurée par la culture d'une seule espèce, l'hévéa, dont la quasi-totalité des plantations est constituée de variétés à haut rendement en latex, mais totalement sensibles à *Microcyclus*. Le Cirad et Michelin conduisent, en partenariat au Brésil (CMB), un programme d'amélioration génétique exploitant les résistances naturelles identifiées dans les ressources génétiques de la plante. L'enjeu est double. Il vise d'une part le développement de l'hévéaculture en Amérique Latine, zone d'endémisme de la maladie, et d'autre part l'anticipation des risques d'introduction de *Microcyclus* dans les zones de production, localisées principalement en Asie du Sud-Est. Le présent projet nous a permis d'intensifier les recherches en génétique et génomique et d'améliorer ainsi nos connaissances sur la nature et la diversité des gènes conférant des résistances durables. Parallèlement, cela nous a également permis de développer de nouveaux outils d'identification, de marquage et de sélection de ces gènes.

Identification de facteurs génétiques de résistance par deux approches convergentes : cartographie génétique et clonage de gènes candidats

L'objectif premier était d'identifier les facteurs génétiques majeurs déterminant la résistance de plusieurs variétés d'hévéa. L'application de la cartographie génétique sur descendances nous avait antérieurement permis d'identifier de tels facteurs chez une première variété. Trois autres variétés, d'origines génétiques diversifiées, et présentant des résistances efficaces, ont été mises à disposition du projet. Cinq de leurs descendances (2 en Guyane et 3 au Brésil), de plusieurs centaines d'individus chacune, avaient été créées par le programme CMB. Le niveau de résistance de chaque descendant a été évalué soit en conditions naturelles d'infestation (au champ), soit en conditions d'inoculations contrôlées. Parallèlement, la cartographie de leur génome a été réalisée, à Montpellier, à l'aide d'une collection préexistante de plusieurs centaines de marqueurs moléculaires, permettant le balisage complet des chromosomes, mais n'ayant pas de lien fonctionnel avec la résistance. Le second objectif du projet était d'enrichir cette ressource moléculaire par le clonage et la cartographie de gènes exprimés associés à la maladie, le principe étant de révéler s'il y a une relation entre variabilité du génome, révélée par les marqueurs moléculaires, et le niveau de résistance des individus.

Résultats majeurs du projet :

Nous avons pu montrer que la résistance à *Microcyclus* de chacune des variétés étudiées est majoritairement gouvernée par 1 gène majeur, différent pour chacune des variétés, et non par la combinaison de nombreux gènes à effet faible. Cette découverte originale offre des perspectives très favorables de création de variétés améliorées, à partir d'un nombre très réduit de gènes de résistance. Autres résultats : clonage de 6958 gènes liés à l'infection, caractérisation de 489 gènes candidats et identification 125 nouveaux marqueurs moléculaires. Ce projet renforce la position de leader du Cirad et de Michelin sur ce sujet et a généré de nouveaux partenariats scientifiques au Brésil.

Production scientifique :

Le projet avait pour vocation la communication des résultats dans le domaine public (publications dans des revues internationales : 1 publiée, 1 soumise et 2 en préparation ; 8 communications dans des congrès en France ou au Brésil) ; plus de 2000 séquences ont été enregistrées dans les bases de données internationales.

Par ailleurs, en plus de l'identification de facteurs de résistance, la cartographie génétique a conduit à identifier des descendants résistants et de niveau de production potentiellement amélioré. Ceux-ci seront évalués plus précisément, à partir de 2011, dans des essais à plus grande échelle au Brésil.

Illustration :

Au premier plan, dégâts causés par *Microcyclus ulei* sur une variété d'hévéa sensible (plantation Michelin de Bahia, PMB, Mai 2004).

A l'arrière plan, variété tolérante au feuillage sain, illustrant l'existence de résistances naturelles efficaces au sein des ressources génétiques de l'hévéa (photo : M. Seguin).



Informations factuelles :

GENESALB est un projet de recherche appliquée, coordonné par le Cirad et associant des institutions publiques et privées, françaises et brésiliennes (Cirad, UESC, Michelin France et Brésil). D'une durée de 36 mois (Janvier 2008 à Décembre 2010), il a bénéficié d'une aide de l'ANR de 400 000

€, pour un montant total de l'ordre de 1 150 000 €. La dotation ANR a notamment permis le recrutement de 2 CDD de 18 mois chacun, par Michelin (France) : 1 technicienne de laboratoire, recrutée par la suite au Cirad en CDI (Mme Sandra Espéout) et 1 chercheur post-doc en génomique (M. Philippe Cubry), actuellement présélectionné pour un contrat post-doc aux Etats-Unis.

B.2 RESUME CONSOLIDE PUBLIC EN ANGLAIS

Genetics and genomics of the resistance to a devastating disease in rubber tree

Improved use of genetic resources of rubber tree against the disease that threaten worldwide natural rubber production

The South American Leaf Blight (SALB) caused by the fungus *Microcyclus ulei* represents a threat to the natural rubber commodity chain and to the 30 million farmers from Southern countries depending on this activity for their living stability. The cultivated species *Hevea brasiliensis* is a tree native from the Amazon basin whose domestication for rubber production began 135 years ago in South East Asia, in SALB-free environment. Most of rubber tree plantations worldwide are constituted of varieties with high latex yield, but fully sensitive to SALB. CIRAD and Michelin collaborate on a breeding program (CMB, Cirad Michelin Brésil) aiming at the creation of new varieties, both high yielding and tolerant to SALB. The objective is both to allow rubber farming development in Latin America, endemically affected by the disease, and to prevent the risk of accidental introduction of the pathogen in the producing regions (Asia & Africa). The objective of the present project was to enforce researches in molecular genetics of SALB resistance. It was proposed to combine complementary actions in genetic mapping and in candidate genes identification for speeding the characterization of resistance genes and ultimately setting a marker-aided selection program.

Genetic mapping and candidate genes: two complementary approaches for genetic analysis of disease resistance

The goal of the present project is to reveal the diversity of SALB resistance factors in order to rationalize genetic improvement programs. The research activities were structured in three fully connected sub-projects: 1) Genetic mapping of new sources of resistance, i.e. new progenies from different resistant varieties, and map integration of candidate expressed genes. 2) Development of molecular genetic markers allowing integration of candidate genes identified in subproject 3. 3) Candidate genes identification based on their expression profile during disease development in either resistant or susceptible varieties. Results obtained in any sub-project were used by the two others. Previous development of genetic mapping allowed us unraveling the genetic determinism of SALB resistance from one rubber tree variety. Three additional cultivars showing promising SALB resistance and 5 of their progenies, created in the frame of the CMB program and available in Brazil or French Guiana, were analyzed in the project.

Results:

Our results show that SALB resistance is mainly governed by major resistance genes and each of the cultivar analyzed by genetic mapping led to the identification of a new resistance factor. These original results constitute a favorable context for a marker aided selection of cultivars combining high yield and high level of SALB tolerance.

Other results: cloning of 6958 expressed genes associated with the disease, characterization of 489 candidate genes and set up of 125 additional genetic markers. The project strengthens the leadership of Cirad and Michelin on this topic, and helped generating new partnership in Brazil.

Scientific production:

All the results will be published in peer reviews or released in public databases. One paper is published on line, 1 was submitted and 2 other are in preparation. We also made 8 communications in international or national (in France or Brazil) conferences. Around 2000 sequences were registered in Genbank/dbEST public database. Genetic mapping allowed identification of resistance factors, but also of SALB resistant individuals with a potentially improved latex yield. These plants will be, next years, more precisely evaluated in large scale trials in Brazil.

Additional information:

GENESALB is France-Brazil applied research project coordinated by Cirad. The partnership encompasses a French public research institution (Cirad, Montpellier and French Guiana), a private company (Michelin, France and Brazil) and a Brazilian university (UESC, Bahia). This 3 years (2008-2010) project received from the ANR a grant of 400 000 € for a total cost of 1 150 000 €. Among others, this grant allowed funding of two 18 months positions devoted to the project: 1 laboratory assistant and 1 post-doc researcher.

C MEMOIRE SCIENTIFIQUE

Mémoire scientifique confidentiel : ~~oui~~/ non

Les partenaires du projet sont d'accord pour que le mémoire scientifique ne soit pas confidentiel. Par contre, les partenaires demandent que les informations supplémentaires, fournies en annexes pour aider à l'évaluation du projet, restent confidentielles et ne soient pas diffusées dans l'attente de leurs publications.

Le projet GENESALB était structuré en 3 sous-projets complémentaires et convergents. Les parties C2, C3, C4 et les annexes sont présentées suivant ce découpage. Les annexes fournissent des informations et résultats supplémentaires :

- **ANNEXE 1 – Sous-projet 1 «Cartographie génétique » (SP1), informations, tableaux et figures supplémentaires**: Partie C3 plus détaillée ; 2 tableaux descriptifs des résultats de cartographie génétique et détection de QTL (tableaux SP1.1, SP1.2 et SP1.3) ; 2 figures présentant 2 des cartes génétiques construites (Fig. SP1.1 et SP1.2).
- **ANNEXE 2 - Sous-projet 2 « Développement de marqueurs» (SP2), informations et figures supplémentaires** : 1 schéma du « workflow » (figure SP2.1) mis en œuvre pour le développement de marqueurs génétiques dans les gènes candidats ; 1 illustration (figure SP2.2) de la cartographie sélective (bin-mapping) pour 1 groupe de liaison (g1).
- **ANNEXE 3 - Sous-projet 3 « Gènes candidats » (SP3), compte-rendu plus détaillé** : reprend de façon plus détaillée les éléments présentés dans les parties C3, C4 et C6.

C.1 RESUME DU MEMOIRE

La maladie sud-américaine des feuilles (SALB pour South American Leaf Blight), due au champignon ascomycète *Microcyclus ulei*, fait peser une menace réelle sur l'hévéaculture mondiale dont dépendent 30 millions de petits planteurs des pays du sud. L'hévéa (*Hevea brasiliensis*) est un arbre originaire d'Amazonie dont la domestication a débuté il y a 135 ans en Asie du Sud-Est. La quasi-totalité des plantations d'hévéa dans le monde est constituée de variétés présentant un haut rendement en latex mais totalement sensibles à *Microcyclus*. Le Cirad et Michelin collaborent depuis 1992 à un projet CMB (Cirad-Michelin-Brésil) visant à l'obtention de variétés à la fois tolérantes à *Microcyclus* et productrices en latex afin, d'une part, de permettre le développement de l'hévéaculture en Amérique Latine, zone d'endémisme de la maladie et, d'autre part, de prévenir les risques d'introduction du pathogène dans les pays producteurs d'Asie et d'Afrique. La cartographie génétique moléculaire avait été appliquée à l'analyse du déterminisme génétique (détection de gènes majeurs et de Quantitative Trait Loci, QTL) de la résistance d'une première accession, RO38 (Lepinasse et al. 2000a; Le Guen et al. 2007). Le projet GENESALB visait à renforcer l'investissement en recherche sur l'identification de facteurs génétiques de résistance à *Microcyclus*, en combinant deux approches complémentaires : cartographie génétique et clonage de gènes différentiellement exprimés au cours de l'infection (gènes candidats).

L'objectif premier était d'identifier les facteurs génétiques majeurs déterminant la résistance, à partir de sources diversifiées, *i.e.* plusieurs variétés résistantes et d'origines géographiques et génétiques différentes (**sous-projet 1, SP1**). Nous avons retenu 3 nouvelles variétés présentant des résistances efficaces. Cinq descendances étaient disponibles au Brésil ou en Guyane pour être évaluées sur leur résistance. La cartographie génétique a été réalisée, à Montpellier, principalement par marqueurs microsatellites génomiques (gSSR). Le second objectif du projet était de compléter cet outil par le clonage et le séquençage de gènes (EST) dont les variations d'expression sont associées à l'infection par *Microcyclus* (gènes candidats, **sous-projet 2, SP2**). Des banques soustractives (SSH) ont été construites pour 2 couples de variétés sensibles *vs* résistantes. Les profils d'expression de ces gènes au cours de l'infection ont été analysés par hybridation sur membranes haute densité (macro-arrays) et PCR quantitative (qPCR). Il s'agissait ensuite de développer des marqueurs génétiques à partir de ces séquences de gènes candidats afin de les intégrer dans les cartes génétiques. Plusieurs méthodes ont été testées (EST-SSR, SNP/HRMA, séquençage de BAC ; **sous-projet 3, SP3**).

Nous avons pu montrer que la résistance à *Microcyclus* de chacune des 3 variétés nouvellement étudiées, est majoritairement gouvernée par 1 gène ou QTL majeur, différent pour chacune des variétés, et non par la combinaison de nombreux QTL à effet faible. Cette découverte originale offre des perspectives très favorables de création de variétés améliorées, à partir d'un nombre très réduit de gènes de résistance. Les autres résultats importants concernent 1) le clonage de 6858 uni-gènes liés à l'infection (banques SSH), la caractérisation de 489 gènes candidats, sélectionnés sur la base de leurs profils d'expression au cours de l'infestation et 3) l'identification de 125 nouveaux marqueurs moléculaires (EST-SSR) qui ont servi à compléter les cartes construites dans le projet.

C.2 ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

SP1. Cartographie génétique

Lors de la conception du présent projet, le déterminisme génétique de résistance à *Microcyclus* n'était connu que pour une seule source de résistance, la variété RO38 (Le Guen et al. 2007). Cette résistance est, de plus, contournée au Brésil, comme en Guyane (données non publiées, CMB). La mise en place d'un programme de sélection assistée par marqueur (SAM) impliquait d'analyser préalablement d'autres sources de résistance, pour évaluer la nature et la diversité des facteurs génétiques à sélectionner. Une analyse préliminaire d'une seconde variété (FX2784) en Guyane avait révélé l'existence d'un gène de résistance différent de ceux de RO38. Par ailleurs, le programme de sélection CMB avait permis d'identifier des variétés présentant des résistances durables (Le Guen et al.

2008), ces résistances se caractérisant par une prévention du développement complet du cycle biologique de *Microcyclus*. Il apparaissait donc prioritaire d'établir le déterminisme génétique de ce type de résistance ou d'autres types de résistance mais d'origines génétiques variées.

SP2. Développement de marqueurs

Les marqueurs moléculaires d'hévéa disponibles au lancement du projet, étaient essentiellement de marqueurs microsatellites génomiques (gSSR) développés par le Cirad : 389 gSSR issus de banques enrichies en SSR (Seguin et al. 2008; Le Guen et al. 2010) et 29 issus d'extrémités de clones BAC (Seguin et al. 2006). En 2009, 30 marqueurs microsatellites de gènes exprimés (EST-SSR) ont été publiés par une équipe chinoise (Feng et al. 2009). Aucune de ces ressources n'avaient été spécialement développée pour l'étude de la résistance à *Microcyclus*. Le SP2 de GENESALB avait pour objectif le développement de marqueurs pour la cartographie génétique de gènes exprimés en relation avec la sensibilité ou la résistance à *Microcyclus*. Deux sources de gènes (EST) était envisagées : les séquences disponibles dans les banques de données internationales (EMBL/Genbank) dont la fonction putative est liée au mécanisme de défense ou de résistance, et les SSH-EST spécifiquement produits par le SP3 de GENESALB.

SP3. Gènes candidats

Au début de ce projet, les ressources moléculaires disponibles issues d'études du transcriptome de l'hévéa concernaient principalement le laticifère, avec pour objectif de mieux comprendre les événements moléculaires régissant la physiologie du latex, et plus particulièrement la biosynthèse du caoutchouc. Ces données moléculaires représentaient une première base pour l'exploration des gènes candidats. Toutefois, des analyses transcriptomiques supplémentaires, ciblant plus spécifiquement l'interaction *Hevea* / *Microcyclus*, étaient nécessaires. S'appuyant sur les plateformes de génomique du CIRAD (UMR-dap, Montpellier, France) et de l'Université de Santa Cruz (UESC, Ilhéus, Bahia, Brésil), de nouvelles ressources moléculaires ont été produites à partir de génotypes sensibles (PB260, PB314) et résistants (RO38, MDF180). Ces ressources peuvent servir, en génomique fonctionnelle, à la compréhension des mécanismes moléculaires de la résistance à *Microcyclus*, mais permettaient d'abord le développement de nouveaux marqueurs polymorphes pour les études de cartographie.

C.3 APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

SP1. Cartographie génétique

Nous avons appliqué la cartographie génétique et détection de QTL (Quantitative Trait Locus) sur descendance, pour l'identification et le marquage de facteurs de résistance à *Microcyclus*. Nous disposons pour cela de plusieurs descendance de grande taille, disponibles au Brésil ou Guyane, et répondant à 3 critères : 1) parents résistants d'origines génétiques différentes, 2) types de résistance et 3) disponibilité de données préliminaires confirmant la ségrégation de la résistance. Les populations de cartographie retenues (tableau 1) sont des descendance de premières générations (F1) issues de croisements de type sensible x résistant entre parents hétérozygotes. Au total, le projet s'est appuyé sur 5 descendance, issues de 4 géniteurs résistants. Les descendants des croisements représentés à la fois au Brésil et en Guyane sont différents, permettant toutefois une analyse multi locale.

Tous les descendants ont été évalués pour la résistance à *Microcyclus* au champ, *i.e.* en conditions naturelles d'infestation. Les descendance de Guyane ont été implantées dans des essais avec répétitions : 4 arbres greffés par descendant. Au Brésil, les essais étaient sans répétitions, avec un seul arbre par descendant, issu de germination (seedlings). Dans tous les cas, les mesures ont été réalisées sur la totalité des arbres, par 12 à 20 passages successifs réalisés sur 2 à 4 ans. Les données utilisées ont été obtenues antérieurement au projet pour toutes les descendance et complétées par 12 passages successifs en 2009-2010 au Brésil. Deux descendance de Guyane (tableau 1) ont été, en plus, évaluées en conditions d'inoculations contrôlées, mais l'analyse des données n'étant pas achevée, ces travaux ne sont présentés qu'en annexe. Les marqueurs utilisés ont été principalement des gSSR, complétés par des EST-SSR issus du SP2 et des AFLP (tableau 1) et génotypés sur séquenceurs à Montpellier

(UMR-dap). Les cartes ont été construites suivant la stratégie de double pseudo-testcross, avec établissement de 2 cartes parentales indépendantes, pour chaque descendance.

Tableau 1 : Descendances retenues et analyses développées, dans le projet, pour la cartographie de QTL. le génome entier de l'hévéa comprend 18 Groupes de Liaison (GL). SALB : résistance à *Microcyclus ulei* ; Col : tolérance à *Colletotrichum gloeosporioides* ; Cir : croissance en circonférence ; PMB : plantation Michelin de Bahia (Brésil) ; PEM : Plantation Edouard Michelin (Mato Grosso, Brésil) ; Combi : station expérimentale de Pointe Combi (Cirad, Guyane).

Descendances	Nombre de descendants	Locali-sation	Cartographie génétique moléculaire		Evaluation agronomique (phénotypage)	
			Couverture du génome	Marqueurs utilisés	Conditions naturelles (champ)	Inoculations (souches de <i>M. ulei</i>)
PB235xFDR5597	200	Brésil-PMB	génome entier	SSR	SALB, Col, Cir	-
PB260xMDF180	351	Guyane	génome entier	SSR, AFLP	SALB	1 souche
PB260xMDF180	171	Brésil-PMB	génome entier	SSR	SALB, Col, Cir	4 souches
PB260xFX2784	295	Brésil-PEM	1 GL : g2	gSSR	SALB	-
PB260xRO38-sup ^a	312	Guyane	4 GL	gSSR	-	1 souche

^a descendants supplémentaires par rapport à ceux analysés par Lespinasse *et al.* (2000a et b) et Le Guen *et al.* (2003 et 2007)

SP2. Développement de marqueurs

Un work-flow de développement et de test de marqueurs génétiques a été établi et testé dans le cadre du projet (Fig. SP2.1). Différentes sources de marqueurs ont été utilisées, on peut noter parmi celles-ci les séquences d'EST d'hévéa disponibles dans les banques de données internationales, les séquences EST développées spécifiquement pour ce projet (banques SSH, voir SP3). La priorité a été donnée au développement de marqueurs microsatellites (EST-SSR ; voir rapport de K. Bouchata 2009), car ceux-ci sont relativement simples d'emploi, reproductibles et rapides à mettre en œuvre sur différentes plateformes (séquenceurs LiCor ou capillaire ABI), mais des polymorphismes de types SNP ont également été testés à l'aide de la technique HRMA (High Resolution Melting Analysis). Pour tester le polymorphisme des marqueurs, nous avons appliqué la méthode de la cartographie sélective ou bin-mapping (Vision *et al.* 2000) permettant, à partir d'une carte de référence et d'un nombre restreint de descendants (bin-set) sélectionnés à l'aide du logiciel MapPop, de localiser les marqueurs dans des intervalles de cartes (bin). Une troisième voie de recherche de marqueurs gSSR a été initiée : dans des séquences de clones BAC correspondant à des zones cibles du génome. Les méthodes et les résultats obtenus pour cette approche « clones BAC » sont décrits en annexe 2

SP3. Gènes candidats

Pour l'identification des gènes candidats nous avons appliqué 3 méthodes complémentaires : 1) le clonage de gènes différentiellement exprimées au cours de l'infection par *M. ulei* par SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) ; 2) l'analyse de leur profil d'expression à différents points de cinétique de l'infection par hybridation en macro-arrays et RT-qPCR ; 3) la détermination de leur fonction biologique putative par homologie de séquence avec des gènes connus (utilisation de blastx et Blast2GO). Des banques SSH ont été produites à partir de 2 couples de variétés : PB314 (sensible) et MDF180 (résistant) à l'UESC au Brésil, PB260 (sensible) et RO38 (résistant) au Cirad en France. Plusieurs banques ont été construites correspondant à des motifs sensible *vs* résistants et inoculé *vs* non inoculé avec des souches isolées de *M. ulei*. Les ARN ont été extraits à partir de feuilles prélevées entre 6 à 96 heures (h ai) et 4 à 54 jours après inoculations (j ai). Les séquences de chaque banque ont été traitées et assemblées, à l'aide du pipeline ESTtik (Argout *et al.* 2008) pour l'identification des séquences non redondantes (sets unigènes) à déposer sur membranes hautes densités (macro-arrays). Les hybridations et leur analyse ont été réalisées à Montpellier et menées indépendamment pour les 2 couples PB314-MDF180 et PB260-RO38. Les cibles hybridées sur les membranes correspondaient à des ARN extraits de jeunes feuilles à différents temps après infection.

C.4 RESULTATS OBTENUS

SP1. Cartographie génétique

Nous avons construits 6 cartes parentales couvrant l'ensemble du génome pour les 3 descendance PB260 x MDF180 - Guyane, PB260x MDF180-Brésil et PB235xFDR5597, et 2 cartes du groupe de liaison (g2) pour FX2784 (tableau SP1.1). La carte de FDR5597 est illustrée figure SP1.1. Les cartes de PB260 dans le croisement avec FX2784 et la carte partielle de RO38 non finalisées, ne sont pas présentées. FX2784 mis à part, les cartes comprennent de 139 à 260 marqueurs génotypés sur 171 à 351 descendants. Sauf pour PB260xMDF180-Guyane où 187 marqueurs AFLP ont été ajoutés, la cartographie a été réalisée uniquement à l'aide de SSR. Les cartes couvrant l'ensemble du génome ou le GL cible pour FX2784, nous avons pu les utiliser pour la détection de QTL sur les données d'évaluation de la résistance au champ.

Chez MDF180-Guyane, la résistance à *Microcyclus* est apparue comme un caractère qualitatif, la moitié des descendants étant sensibles et les autres résistants, et le caractère a pu être codé en présence:absence, et intégré comme un marqueur génétique. Le gène majeur correspondant que nous avons dénommé *M15md* est localisé sur le groupe de liaison g15 (Fig. 1).

De même pour FX2784, des travaux préliminaires avaient conduit à identifier un gène majeur, localisé sur le GL g2 et que nous avons nommé *M2fx*, déterminant à lui seul la résistance de FX2784 en Guyane. Nous avons analysé le même croisement par FX2784 au Brésil (plantation PEM) en ne génotypant que des marqueurs situés sur g2. Les résultats confirment la présence et la localisation de ce gène majeur, déterminant également une résistance complète qualitative au Brésil (Fig. SP1.2). Chez FDR5597, la résistance à *Microcyclus* s'est révélée quantitative, ne permettant pas de la coder comme un marqueur, mais elle est néanmoins apparue gouvernée essentiellement par 1 QTL majeur, expliquant à lui seul jusqu'à 62% (R^2) de la variance de la résistance (tableau 2 et tableau SP1.2). Il est possible que dans un essai avec répétitions, ce QTL s'exprime comme un gène majeur. De plus, ce QTL co-localise avec un des 2 QTL détectés en g14 chez MDF180 (tableau SP1.2).

Tableau 2 : Synthèse des QTL ou gènes majeurs de résistance à *Microcyclus ulei* (SALB) détectés au champ. **En gras : QTL majeurs (LOD > 20) et gènes majeurs (résistance qualitative).** Aucun QTL n'a été trouvé significatif sur les cartes parentales de PB260-Guyane, PB260-Brésil et PB235-Brésil.

Cartes parentales		QTL (désignés par leur groupe de liaison) et gènes majeurs (M#)							
MDF180-Guyane	g1	-	-	-	-	g13-2	-	g14-2	<i>M15md</i>
MDF180-Brésil	-	-	-	-	-	-	-	g14-2	g15 ^c
FDR5597-Brésil	-	-	g9	-	-	-	-	g14-2	-
FX2784-Brésil	-	<i>M2fx</i>	-	-	-	-	-	-	-
FX2784-Guyane ^a	-	<i>M2fx</i>	-	-	-	-	-	-	-
RO38-Guyane ^b	-	-	-	g10	<i>M13-1bn</i>	-	g14-1	-	-

^a résultats obtenus antérieurement au projet, non publiés et déclarés comme "enabling technologies"

^b résultats obtenus antérieurement au projet sur la population initiale de 192 F1 (Le Guen et al. 2003)

^c co-localisation avec *M15md*

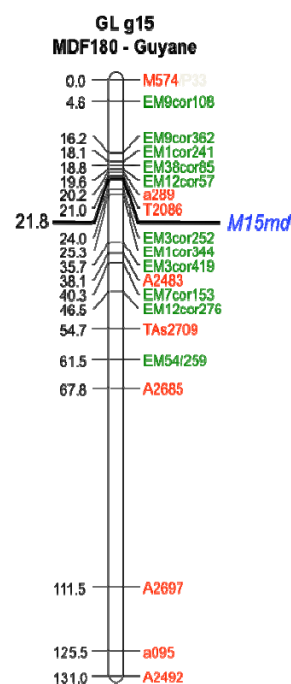


Figure 1 : Carte parental du GL g15 comprenant le gène majeur de résistance *M15md* à *M. ulei* détecté chez MDF180-Guyane (d'après Le Guen et al. 2011). Marqueurs : gSSR ; AFLP. A gauche : distances en centi-Morgan (cM) ; à droite : nom des marqueurs.

Ainsi, les 4 géniteurs résistants analysés en cartographie/QTL - RO38 (Le Guen et al. 2003), FX2784, MDF180 et FDR5597 – ont chacun révélé 1 gène ou QTL majeur localisé sur des GL indépendants - g13, g2, g15 et g14 respectivement. En complément, 5 QTL à effets faibles ont été détectés (tableaux 2 et SP1.2) et la résistance au SALB chez l'hévéa apparaît majoritairement gouvernée par des « gènes majeurs ». Seul MDF180-Brésil fait exception avec seulement 2 QTL mineurs détectés. Ces 2 QTL colocalisent avec ceux détectés en Guyane, mais le QTL en g15 qui colocalise avec le gène majeur *M15md* n'a, au Brésil, qu'un effet faible (LOD = 3,5 ; R^2 = 14%). De plus, le QTL g13-2 détecté sur la population de Guyane (tableau SP1.2), n'a pas été détecté au Brésil.

SP2. Développement de marqueurs

Marqueurs EST-SSR : Nous avons identifié 757 séquences SSR à partir d'un set de 11 229 unigènes d'hévéa. Nous avons testé 261 marqueurs SSR par PCR ciblée sur 226 SSH-EST et 35 ADNc d'EMBL dont la fonction est liée aux caractères de défense et de résistance chez les plantes. Le type de motifs SSR trouvés dans les EST-SSH est majoritairement di-nucléotidique (tableau 3), comme pour les gSSR.

Nous avons défini un bin-set de 14 individus pour PB260xRO38 et un autre de 15 individus pour PB260xMDF180 de Guyane. Le taux de polymorphisme des EST-SSR, testé sur les 2 bin-sets et sur tous les parents de cartographie, apparaît élevé ($125/261 = 48\%$), même si, comme attendu, il est plus faible que pour les gSSR (~70%). Ainsi, 125 EST-SSH dont 31 gènes candidats et environ 150 autres EST issus d'EMBL, peuvent être intégrés aux cartes génétiques grâce au polymorphisme des EST-SSR. La fiabilité du bin mapping a été validée par cartographie classique pour 79 de ces gSSR (tableau SP1.1 et Fig. SP1.1), confirmant la prédiction de la localisation de carte pour 72/79 (91%) des cas, montrant l'efficacité de la méthode.

Tableau 3 : Types de motif SSR détectés dans les EST d'hévéa et taux de polymorphisme révélé sur un échantillon de 19 accessions : 18 accessions représentatives de la diversité d'*Hevea brasiliensis* et 1 accession d'une espèce sauvage apparentée, *Hevea benthamiana*.

Type de SSR	Nombre de séquences	Nombre de SSR polymorphes	Pourcentage de SSR polymorphes
Dinucléotide	116	90	78
Trinucléotide	84	59	70
Tetranucléotide	7	3	43
Pentanucléotide	5	4	80
Hexanucléotide	4	3	75
Composites	10	5	50
Total	226	164	73

Marqueurs EST-SNP : Un sous ensemble de 678 unigènes (gènes candidats) avait été identifié par le SP3, après une première analyse des résultats des macro-arrays et ajout d'un certain nombre de gènes d'intérêt particuliers, tels que des analogues de gènes de résistance (Resistance Gene Analogues, Rga). Une recherche de SNP *in silico* a été effectuée, à l'aide du pipeline ESTtik, à partir des alignements de séquences dans les contigs présentant un nombre suffisant de séquences chevauchantes. Nous avons pu identifier 62 unigènes présentant au moins un SNP. Quatorze couples d'amorces ont été définis spécifiquement pour le génotypage de SNP par HRMA ; 11 ont donné un produit d'amplification spécifique et 7 (50%) ont présenté des groupes possédant des profils de courbes de fusion différents correspondants potentiellement à des allèles différents. Deux de ces marqueurs ont été génotypés sur descendances complètes, mais n'ont pas pu être cartographiés.. Il est apparu que la distinction entre les allèles aux SNP n'était pas assez nette et générait un risque élevé d'erreurs de génotypage.

SP3. Gènes candidats

Onze banques ont été construites. Le détail de chaque banque est fourni dans le tableau SP3.2. L'assemblage en contig de la totalité des séquences brutes (reads) a permis d'identifier 5509 singletons et 1349 contigs, soit un set de 6858 EST « unigènes ». La comparaison des banques SSH, construites à partir de feuilles infectées entre 6 h et 4 j ai chez les 4 génotypes, révèle un faible nombre de séquences

identiques entre 2, 3 ou 4 banques (Fig. SP3.1). Une analyse plus fine de quelques gènes cibles (sélectionnés sur leur fonction) permettrait d'identifier les causes de ces différences : différents fragments d'un même gène dans des banques différentes, allèles, paramétrage de l'assemblage...

Les analyses d'expression par macro-arrays ont permis d'identifier 312 unigènes-EST-SSH différemment exprimés chez PB314 *vs* MDF180 et 177 chez PB260 *vs* RO38. La figure 2 montre la répartition de ces gènes candidats par profils d'expression pour PB260 et RO38. On observe un nombre 2 à 3 fois plus grand de gènes sous- ou surexprimés chez le sensible (PB260) que chez le résistant (RO38).

Au total, ce sont $312 + 177 = 489$ gènes candidats pour lesquels des marqueurs génétiques sont à rechercher en vue de leur cartographie. Pour 31 gènes candidats, des marqueurs EST-SSR polymorphes ont d'ores et déjà été identifiés (voir ci-dessus, SP2). L'étude d'expression complémentaire par RT-qPCR a été initiée et a permis de valider 4 gènes candidats (voir rapports de stage de E. Goujon 2009 et 2010).

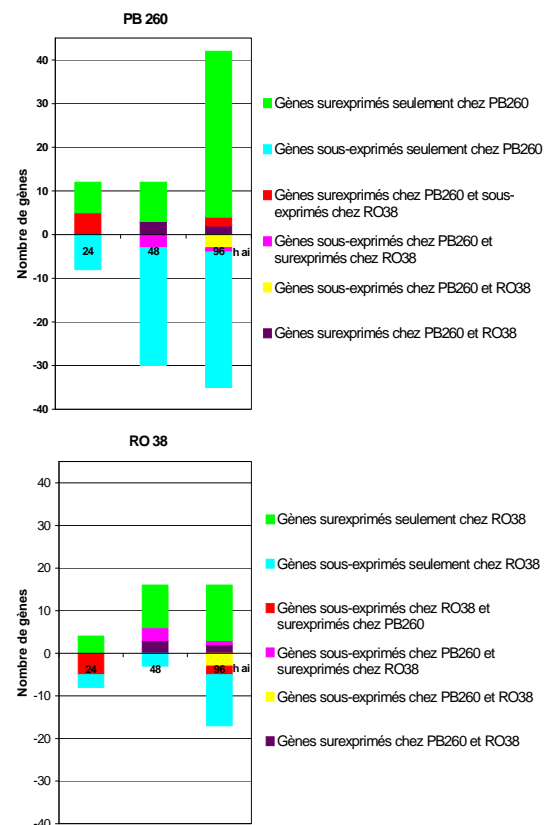


Figure 2 : Histogrammes de répartition, par profils d'expression, des gènes différemment exprimés après inoculation chez PB260 et RO38.

C.5 EXPLOITATION DES RESULTATS

Les EST-SSH produits constituent une ressource moléculaire nouvelle qui pourra être exploitée pour l'analyse fonctionnelle de voies métaboliques spécifiques, en particulier pour la réponse aux stress biotiques. Mais les gènes candidats, sélectionnés sans *a priori* de fonction mais d'après leur différentiel d'expression (macro-arrays) ont d'ores et déjà servi à produire des marqueurs moléculaires (125 EST-SSR) qui eux mêmes ont été utilisés pour la cartographie génétiques dans le projet. La cartographie QTL a permis de révéler et marquer 3 gènes et QTL majeurs et les données de génotypage produites serviront, dans le cadre du programme d'amélioration CMB à la sélection d'hévéas présentant un bon niveau de résistance à *Microcyclus*.

C.6 DISCUSSION

Les objectifs du projet ont été atteints. Conformément aux attentes, l'analyse par cartographie/QTL de nouvelles sources diversifiées de résistance a produit un résultat très important et inattendu : l'identification de 2 nouveaux gènes majeurs (*M2fx* et *M15md*) et d'1 QTL majeur sur le GL g14. Ces résultats étaient inattendus plus particulièrement dans le cas de la résistance partielle et durable de MDF180 (Le Guen et al. 2008). Ainsi, la résistance de l'hévéa à *Microcyclus*, apparaît principalement gouvernée par des gènes ou QTL majeurs, puisque chacun des 4 géniteurs résistants analysés a révélé 1 de ces gènes. De plus, nous avons démontré la faisabilité de détection QTL dans des essais sans répétitions, issus du semis de graines (seedlings). Ceci constitue une forte valorisation du matériel créé par le programme CMB. Des milliers de génotypes, issus de croisements contrôlés, sont conservés au Brésil et pourront être valorisés par la SAM. L'analyse du déterminisme génétique

reste cependant incomplète pour une des descendance : MDF180-Brésil. Ceci est en partie dû à des conditions temporaires de faible pression de *M. ulei* sur la plantation de Bahia (PMB) en 2009-2010. De plus, l'absence de répétitions dans les essais au Brésil a sans doute conduit à une perte de puissance de détection des QTL, mais les résultats obtenus sur FX2784 montrent que cela n'interdit par l'identification de gènes et QTL majeurs. Quoiqu'il en soit, la résistance de MDF180 au Brésil ségrège peu, avec une grande majorité de descendants résistants, et l'hypothèse d'un facteur génétique présent à l'état homozygote chez MDF180 ne peut-être exclue.

Le projet a également permis de produire des marqueurs génétiques dans des gènes codants, ressource qui faisait presque totalement défaut chez l'hévéa. De plus, il s'agit de gènes codants dont l'expression est potentiellement liée au caractère cible, *i.e.* la résistance à *Microcyclus*. Cependant, de nombreux gènes candidats restent à cartographier et il apparaît nécessaire de développer la cartographie de marqueurs SNP à moyen ou haut débit (KASPar, Illumina-Véracode,...). En effet, le projet a bien permis de tester différentes voies du « workflow » de développement de marqueurs, et l'application de la HRMA, par exemple, a montré ses limites. Le temps nécessaire à la réalisation d'expérimentations n'a pas permis de finaliser le développement de marqueurs à partir de clones BAC dont les séquences ne seront disponibles qu'au début 2011. Mais cette partie du programme sera réalisée et devrait fournir de nouveaux marqueurs dans des zones cibles du génome.

Conformément aux objectifs initiaux, un large groupe d'EST différentiellement exprimés a été produit à partir de différentes sources de résistances/sensibilité. Ces résultats ont servi au démarrage du développement de marqueurs EST-SSR et SNP qui viendront enrichir les cartes génétiques de référence. Une meilleure annotation des séquences par comparaison avec plusieurs bases de données et l'analyse intégrative des fonctions associées aux gènes induits ou inhibés par l'infection permettra une première interprétation des voies induites ou réprimées par l'infection dans les différentes variétés et une meilleure sélection des gènes candidats pour des études fines d'expression. L'analyse par RT-qPCR de quelques EST-SSH, choisies d'après leurs homologies de séquence, a permis de confirmer leur différentiel d'expression entre résistant et sensible, et donc de valider la démarche « SSH » pour l'identification de gènes candidats. Pour d'autres, l'absence de différentiel d'expression en RT-qPCR peut s'expliquer par différentes contraintes techniques telles que l'utilisation de souches différentes pour la construction des banques SSH et pour la validation en qPCR, ou la forte variabilité d'une inoculation à une autre, qui nécessiterait un plus grand nombre de répétitions biologiques. La validation par qPCR devra être élargie aux EST-SSH sélectionnées par macro-array (ou du moins une sélection représentative). Le très faible nombre d'EST communes aux banques RO38 et MDF180 pourrait être dû à des mécanismes de résistance distincts, impliquant des gènes ou des cinétiques d'expression très différents. Il sera donc intéressant, lors de la validation de l'expression des EST par qPCR, de poursuivre la comparaison de ces deux sources de résistance, cette fois avec la même souche et une cinétique de prélèvement identique pour les 2 variétés résistantes (de 6h à 10j).

C.7 CONCLUSIONS

Le projet GENESALB nous a permis de réaliser des avancées déterminantes tant au niveau méthodologique (ressources moléculaires (SSH-EST et EST-SSR), bin-mapping) qu'en termes de connaissance du déterminisme génétique de la résistance à *Microcyclus*. Ces résultats renforcent la position de leader du partenariat Cirad-Michelin en génétique de l'hévéa en général et amélioration de la résistance à la maladie sud-américaine des feuilles/SALB en particulier. De plus, nos résultats originaux, montrant des déterminismes dus principalement à des gènes et QTL majeurs, créent une situation très favorable pour la mise en place, dès à présent, d'une sélection assistée par marqueur (SAM). Pour ce faire, l'approche cartographie/QTL devra aussi être appliquée aux caractères liés à la productivité en latex, notamment pour l'identification de facteurs génétiques défavorables provenant du fonds génétique résistant. Le marquage génétique réalisé, et qui sera poursuivi dans les années à venir, constitue d'ores et déjà une valorisation du matériel créé par le programme d'amélioration CMB.

C.8 REFERENCES

- Argout X, Fouet O, Wincker P, Gramacho K, Legavre T, Sabau X, Risterucci A, Da Silva C, Cascardo J, Allegre M et al. 2008. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics* **9**(1): 512.
- Dawes NL, Glassey J. 2007. Normalisation of Multicondition cDNA Macroarray Data. *Comparative and Functional Genomics* **ID 90578**: 12p.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(25): 14863-14868.
- Feng SP, Li WG, Huang HS, Wang JY, Wu YT. 2009. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol Breed* **23**(1): 85-97.
- Le Guen V, Garcia D, Doaré F, Mattos C, Condina V, Couturier C, Chambon A, Weber C, Espéout S, Seguin M. 2011. A rubber tree's durable resistance to *Microcyclus ulei* is conferred by a qualitative gene and a major quantitative resistance factor. *Tree Genet Genomes* **On line first**: DOI: 10.1007/s11295-11011-10381-11297.
- Le Guen V, Garcia D, Mattos CRR, Doaré F, Lespinasse D, Seguin M. 2007. Bypassing of a polygenic *Microcyclus ulei* resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New Phytol* **173**(2): 335-345.
- Le Guen V, Gay C, Xiong T-C, Souza LM, Rodier-Goud M, Seguin M. 2010. Development and characterization of two hundred ninety six new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Breeding* **in press**.
- Le Guen V, Guyot J, Mattos CRR, Seguin M, Garcia D. 2008. Long lasting rubber tree resistance to *Microcyclus ulei* characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop Protection* **27**: 1498-1503.
- Le Guen V, Lespinasse D, Oliver G, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M. 2003. Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight (*Microcyclus ulei*) in rubber tree. *Theor Appl Genet* **108**(1): 160-167.
- Lespinasse D, Grivet L, Troispoux V, Rodier-Goud M, Pinard F, Seguin M. 2000a. Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (*Microcyclus ulei*) in the rubber tree. *Theor Appl Genet* **100**(6): 975-984.
- Lespinasse D, Rodier-Goud M, Grivet L, Leconte A, Legnate H, Seguin M. 2000b. A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea* spp.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theor Appl Genet* **100**(1): 127-138.
- Mattos CRR, Garcia D, Pinard F, Le Guen V. 2003. Variabilidade de isolados de *Microcyclus ulei* no sudeste de Bahia. *Fitopatol bras* **28**: 502-507.
- Seguin M, Attard A, Bataillon T, Billot C, Cenci A, Chantret N, Courtois B, David J, Deu M, El Azhari N et al. 2006. Analysis of linkage disequilibrium patterns in perennial or annual, autogamous or allogamous plant species. In *6ème Colloque National du BRG Ressources Génétiques : des Ressources Partagées*, pp. 57-74. BRG, Paris, France, La Rochelle, 2-4 October 2006.
- Seguin M, Weber C, Fouet O, Rodier-Goud M. 2008. Integration of microsatellite (SSR) markers in *Hevea* spp. reference genetic map: a powerful tool for genetic analysis of qualitative and quantitative agronomic traits. In *IRRDB 2008 IRRDB International Natural Rubber Conference and Annual Meetings*, pp. 1-7, Kuala Lumpur, 13-14 October 2008.
- Vision TJ, Brown DG, Shmoys DB, Durrett RT, Tanksley SD. 2000. Selective Mapping: A Strategy for Optimizing the Construction of High-Density Linkage Maps. *Genetics* **155**(1): 407-420.

D LISTE DES LIVRABLES

Quand le projet en comporte, reproduire ici le tableau des livrables fourni au début du projet. Mentionner l'ensemble des livrables, y compris les éventuels livrables abandonnés, et ceux non prévus dans la liste initiale.

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
2008, 2009, 2010	1.1	Cartes génétiques sur 3 descendance ; marqueurs gSSR, EST-SSR et AFLP	données	M. Seguin S. Espéout V. Le Guen R. Rivallan	réalisé comme prévu ; résultats sur 1 desc. publiés (Le Guen et al. 2011)

Date de livraison	N°	Titre	Nature (rapport, logiciel, prototype, données, ...)	Partenaires (souligner le responsable)	Commentaires
2009	1.2	Cartographie fine de 2 gènes majeurs sur 2 descendances, 1 au Brésil + 1 en Guyane	données	<u>M. Seguin</u> C. Weber	réalisé sur 1 descendance (xFX2784) ; partiellement réalisé sur la 2 ^{ème} (xRO38)
2010	2.1	Evaluation de la résistance à <i>M. ulei</i> de 3 descendances au Brésil	données	<u>F. Granet</u> E. Cavaloc C. Mattos F. Fonseca R. Bortolazzo C. Scomparin	réalisé comme prévu sur 2 ans ; mesures de croissance et de résist ^{ce} au <i>Colletotrichum</i> non prévus initialement
2009, 2011	2.2	Evaluation de la résistance à <i>M. ulei</i> de 2 descendances en Guyane, en conditions d'inoculations contrôlées	données	<u>F. Doaré</u> V. Le Guen	achevé sur 1 descendance (-MDF180) ; achèvement prévu en Avril 2011 pour la 2 ^{ème} (-RO38)
2009, 2010, 2011	3	Analyse QTL : identification de 3 gènes majeurs et 6 QTL mineurs de résistance, sur 4 descendances (Brésil + Guyane)	données	<u>V. Le Guen</u> M. Seguin R. Rivallan	[résultats sur 1 descendance publiés, Le Guen <i>et al.</i> 2011]
2010	4	125 marqueurs EST-SSR polymorphes ; 88 cartographiés sur descendances complètes	ressources moléculaires	<u>P. Cubry</u> , V. Pujade-Renaud M. Seguin X. Argout K. Bouchata	réalisé avec plus d'EST-SSR que prévu
2009	5	6958 unigènes issus de banques SSH	ressources moléculaires	<u>V. Pujade-Renaud</u> <u>D. Garcia</u> X. Argout	[communication à congrès ; séquences déposées dans db-EST: D. Garcia, GenBank ID: JG294245 à JG296383]
2010	6	Identification de 489 gènes candidats issus des banques SSH et sélectionnés d'après leur profil d'expression	ressources moléculaires	<u>V. Pujade-Renaud</u> <u>et D. Garcia</u> A. Berger M. Déon E. Goujon	[communications à congrès ; résultats sur le couple PB314-MDF180, Garcia <i>et al.</i> soumis]
2010, 2011	7	Séquençage GS-Flx de 41 clones BAC hévéa pour l'identification ciblée de marqueurs gSSR	ressources moléculaires	<u>P. Cubry</u> M. Seguin G. Sarah	- 21 clones BAC en Mars 2010 - 20 clones BAC pour Mars 2011 ; recherche de SSR en attente
2010	8	Identification de marqueurs SNP dans des gènes candidats	ressources moléculaires	<u>P. Cubry</u> R. Rivallan	évaluation de la méthode HRMA réalisée
		<i>Création de nouvelles desc. au Brésil pour la poursuite du projet d'analyse génétique de la résistance SALB</i>			<i>Projet modifié : réalisé hors financement ANR/GENESALB</i>

E IMPACT DU PROJET

E.1 INDICATEURS D'IMPACT

Nombre de publications et de communications (à détailler en E.2)

		Publications multipartenaires	Publications monopartenaires
International	Revue à comité de lecture	1 (+1 soumis)	
	Ouvrages ou chapitres		

France	d'ouvrage		
	Communications (conférence)	2	1
	Revue à comité de lecture		
	Ouvrages ou chapitres d'ouvrage		
Actions de diffusion	Communications (conférence)	5	1
	Articles vulgarisation		
	Conférences vulgarisation		
	Autres (<u>rappports de stages</u>)		6

Autres valorisations scientifiques (à détailler en E.3)

	Nombre, années et commentaires (valorisations avérées ou probables)
Brevets internationaux obtenus	
Brevet internationaux en cours d'obtention	
Brevets nationaux obtenus	
Brevet nationaux en cours d'obtention	
Licences d'exploitation (obtention / cession)	
Créations d'entreprises ou essaimage	
Nouveaux projets collaboratifs	2 projets avec l'Unicamp (Sao Paulo, Brésil) : 1) <u>en cours, 2008-2011</u> : 1 thèse Unicamp avec appui scientifique & technique de Michelin et du Cirad 2) <u>projet de réponse à l'AO France-Brésil, ANR-CNPq Avril 2011</u> , « Biodiversité »
Colloques scientifiques	
Autres (préciser)	

E.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Revue à comité de lecture, internationales :

Garcia D., Carels N., de Sousa L.A, Sizenando Andrade S.J., Pujade-Renaud V., Mattos C.R.R., Cascardo J.C.M. EST profiling of resistant and susceptible *Hevea* clones infected by *Microcyclus ulei*. Physiological and Molecular Plant Pathology, Soumis.

[NB : il n'y a pas eu de demande d'autorisation de divulgation pour cet article car il s'agit de résultats mis à disposition du projet par l'UESC, mais obtenus hors financement ANR/Génoplatte]

Le Guen V., Garcia D., Doaré F., Mattos C., Condina V., Couturier C., Chambon A., Weber C., Espéout S., Seguin M (2011). A rubber tree's durable resistance to *Microcyclus ulei* is conferred by a qualitative gene and a major quantitative resistance factor. TGG, on line first, DOI: 10.1007/s11295-011-0381-7.

Communications, conférences internationales :

Argout X., Garcia D., Montoro P., Pujade-Renaud V., Ruiz M., Seguin M., Sidibé Bocs S. (2009). Statement of transcriptomics and bioinformatics analyses conducted at CIRAD in rubber tree: towards the genome analysis. In: *Hevea genome and transcriptome. IRRDB Workshop on Hevea Genome*

- and Transcriptome. Book of abstracts. Montpellier, France: Cirad, IRRDB, IFC, p. 49 (1 p.). 2009/06/03-05, Montpellier, France.
- Garcia D., Carels N., Araújo L.d.S., Koop D.M., Pujade-Renaud V., Silva D.d.C., Mattos C.R.R., Cascardo J.C.M. (2009). Transcriptome comparison of resistant and susceptible *Hevea brasiliensis* cultivars infected by *Microcyclus ulei*. In: *Hevea genome and transcriptome. IRRDB Workshop on Hevea Genome and Transcriptome* Book of abstracts. Montpellier, France: Cirad, IRRDB, IFC, p. 30-48. 2009/06/03-05, Montpellier, France.
- Le Guen V, Garcia D, Doaré F, Weber C, Chambon A, Seguin M (2009) Natural pyramiding provides rubber tree with durable resistance to South American Leaf Blight. In: *Plant-GEM 8, Lisbon 2009*, 7-10 October 2009, Lisbon, Portugal. Poster n° S2.P.16, abstract p.94.

Communications, conférences nationales (France ou Brésil) :

- Seguin M, Granet F, Argout X, Berger A, Bouchata K, Cavaloc E, Cubry P, Doaré F, Espeout S, Fonseca F, Garcia D, Goujon E, Le Guen V, Pujade-Renaud V, Scomparin C, Weber C (2010) GENESALB: Genetic analysis of resistance to South American Leaf Blight – SALB (*Microcyclus ulei*) in rubber tree (*Hevea* spp.). In: *Plant Genomics Seminar 2010*. Pont-Royal en Provence, France, 29-31 Mars 2010. Poster P059, Abstract pp.142-143. Poster.
- Berger A, Déon M, Doaré F, Goujon E, Garcia D, Seguin M, Pujade-Renaud V (2010). Identification de gènes candidats impliqués dans les processus de résistance de l'hévéa à *Microcyclus ulei* par la technique des macroarrays. In: *Journées Jean Chevaugnon*, Aussois, 25-29 Janv 2010. Poster
- Koop D.M., Conceição L., Cardoso S.E.A., Silva D.C., Cascardo J.C.M., Garcia D. (2010) Análise do perfil de expressão de genes de estresse e defesa na interação *Hevea brasiliensis* – *Microcyclus ulei*. In: *56 Congresso brasileiro de Genética*. Guarujá (SP, Brésil) 14-17 setembro 2010. Poster.
- Koop D.M., Andrade C.J., Costa D., Cascardo J.C.M., Garcia D. (2010) Estratégia de identificação de genes de resistência ao Mal-das-folhas em *Hevea brasiliensis*. In: *IIº Congresso brasileiro de heveicultura*. Itabuna (BA, Brésil) 10-13 agosto 2010. Poster.
- Koop D.M., Conceição L., Cardoso S.E.A., de Sousa L.A., Silva D. da C., Garcia D. (2009) Estudo histológico e molecular da morte celular programada (PCD) na interação *Hevea* – *Microcyclus ulei*. In: *XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia*. Rio de Janeiro (Brasil). 3 a 7 agosto de 2009. Tropical Plant Pathology. Vol. 34. S257. Poster 868.
- Seguin M, Argout X, Cavaloc E, Doaré F, Espéout-Fois S, Fonseca F, Garcia D, Granet F, Le Guen V, Mattos C, Pujade-Renaud V, Weber C (2008) GENESALB: Genetic analysis of resistance to South American Leaf Blight – SALB (*Microcyclus ulei*) in rubber tree (*Hevea* spp.). In: *Séminaire Génoplane 2008*. 1-3 Avril 2008, 1p. Arles, France Poster.

Rapport de stages, thèses :

- Daniela Martins Koop (2010) Análise do processo de morte celular em folhas de *Hevea brasiliensis* induzido por *Microcyclus ulei*. Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus, Brasil). Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular. 88p.
- Goujon Eric (2010) Validation par PCR en temps réel de gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction entre l'hévéa et *Microcyclus ulei*. Master 2 BE (Biologie et Environnement), spécialité GEPU (Génomique Ecophysiologie et Productions végétales), Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand. Soutenu le 17 Juin 2010, 76p.
- Bouchata Karima (2009) Cartographie de gènes candidats associés à la résistance de l'hévéa à *Microcyclus ulei*. Rapport de stage de Master 2, Génomique, Ecophysiologie et Production Végétale, Université Blaise Pascal / Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, 54p.
- Goujon Eric (2009) Mises-au-point méthodologiques en vue de la validation par PCR en temps réel de gènes différentiellement exprimés lors de l'interaction entre l'hévéa et *Microcyclus ulei*. Rapport de stage de Master 1, Génétique & Physiologie, Université Blaise Pascal / Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, 36p.
- Déon Marine (2008) Mise en place de la technique des macroarrays pour l'identification de gènes candidats impliqués dans la résistance de l'hévéa à *Microcyclus ulei*. Rapport de stage de Master M2 Professionnel. Master Biologie, Géoscience, Agronomie, Environnement, Spécialité : Biologie et Evolution des Plantes, Université Montpellier II, 39p.
- Le Guen Vincent (2008) Exploration de la diversité des résistances génétiques à la maladie sud-américaine des feuilles de l'hévéa (*Microcyclus ulei*) par cartographie et génétique d'association au

sein de populations naturelles. *Thèse de doctorat*, Université Montpellier II, Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques de Montpellier, 186p.

E.3 LISTE DES ELEMENTS DE VALORISATION

- Renforcement du dispositif de recherche et du partenariat :

Antérieurement au projet GENESALB, les travaux de cartographie génétique de la résistance à *Microcyclus* ont été conduits sur du matériel présent et évalué en Guyane. Le projet a permis le développement de ces activités au Brésil, sur du matériel créé et évalué sur les plantations Michelin.

Au cours de ces trois dernières années, notre partenariat en génétique moléculaire s'est renforcé. Deux projets sont conduits avec le laboratoire du Dr Anete Pereira de l'université de Campinas (Unicamp, Sao Paulo, Brésil), 1 en cours, l'autre en construction :

1) 2008-2011 : une thèse de l'Unicamp est conduite avec l'appui scientifique & technique de Michelin et du Cirad. Il s'agit de la cartographie génétique d'une descendance pour l'analyse du déterminisme de tolérance au froid chez l'hévéa. Une descendance créée dans le cadre de CMB, a été implantée dans un essai clonal à petite échelle sur la plantation PEM (Mato-Grosso) de Michelin. L'étudiante a été accueillie dans notre laboratoire à Montpellier (Avril-Juillet 2009), pour le génotypage et la cartographie de marqueurs gSSR sur cette descendance.

2) projet de réponse à l'AO France-Brézil, ANR-CNPq 2011 « Biodiversité » : Développement de marqueurs SNP et diversité de populations forestières, amazoniennes d'hévéa. Ce projet pourrait impliquer également une équipe de l'EMBRAPA de l'Acre (Brésil).

- Production technique :

1) Collection de 6858 unigènes liés à la résistance à *M. ullei*, issus des banques EST-SSH produites par l'UESC (D. Garcia) et par le présent projet (V. Pujade-Renaud)

2) Production de 125 nouveaux marqueurs EST-SSR permettant la cartographie génétique d'EST-SSH produits par le projet (non publié)

3) Identification de 567 séquences d'EST-SSR supplémentaires issues des banques SSH du projet, non testées pour le polymorphisme (499 séquences) ou monomorphes dans les descendance étudiées ici (68 séquences) ; données non publiées

4) séquences complètes (GS-FLX - Roche) de 41 clones BAC issus de la banque BAC- hévéa - Cirad et correspondant à des gènes candidats (analogues de gènes-R, Rga) ou à des marqueurs proches du gène majeur de résistance M13-1bn (Le Guen *et al.* 2003) ; [disponibles au 1^{er} semestre 2011].

E.4 BILAN ET SUIVI DES PERSONNELS RECRUTES EN CDD (HORS STAGIAIRES)

Ce tableau dresse le bilan du projet en termes de recrutement de personnels non permanents sur CDD ou assimilé. Renseigner une ligne par personne embauchée sur le projet quand l'embauche a été financée partiellement ou en totalité par l'aide de l'ANR et quand la contribution au projet a été d'une durée au moins égale à 3 mois, tous contrats confondus, l'aide de l'ANR pouvant ne représenter qu'une partie de la rémunération de la personne sur la durée de sa participation au projet.

Les stagiaires bénéficiant d'une convention de stage avec un établissement d'enseignement ne doivent pas être mentionnés.

Les données recueillies pourront faire l'objet d'une demande de mise à jour par l'ANR jusqu'à 5 ans après la fin du projet.

Identification				Avant le recrutement sur le projet			Recrutement sur le projet				Après le projet				
Nom et prénom	Sexe H/F	Adresse email (1)	Date des dernières nouvelles	Dernier diplôme obtenu au moment du recrutement	Lieu d'études (France, UE, hors UE)	Expérience prof. Antérieure, y compris post-docs (ans)	Partenaire ayant embauché la personne	Poste dans le projet (2)	Durée missions (mois) (3)	Date de fin de mission sur le projet	Devenir professionnel (4)	Type d'employeur (5)	Type d'emploi (6)	Lien au projet ANR (7)	Valorisation expérience (8)
Espéout Sandra	F	sandra.espeout@cirad.fr	actuelle	Licence pro	France	5	Michelin	Technicien	18	30/09/09	CDI	EPIC de recherche	Technicien	Partenaire du projet (Cirad)	Valorisation des compétences et de l'expérience acquises
Cubry Philippe	H	philippe.cubry@hotmail.fr	Janvier 2011	Doctorat	France	0	Michelin	Post-doc	18	31/12/10	Recherche d'emploi	-	-	-	-

Aide pour le remplissage

(1) **Adresse email** : indiquer une adresse email la plus pérenne possible

(2) **Poste dans le projet** : post-doc, doctorant, ingénieur ou niveau ingénieur, technicien, vacataire, autre (préciser)

(3) **Durée missions** : indiquer en mois la durée totale des missions (y compris celles non financées par l'ANR) effectuées sur le projet

(4) **Devenir professionnel** : CDI, CDD, chef d'entreprise, encore sur le projet, post-doc France, post-doc étranger, étudiant, recherche d'emploi, sans nouvelles

(5) **Type d'employeur** : enseignement et recherche publique, EPIC de recherche, grande entreprise, PME/TPE, création d'entreprise, autre public, autre privé, libéral, autre (préciser)

(6) **Type d'emploi** : ingénieur, chercheur, enseignant-chercheur, cadre, technicien, autre (préciser)

(7) **Lien au projet ANR** : préciser si l'employeur est ou non un partenaire du projet

(8) **Valorisation expérience** : préciser si le poste occupé valorise l'expérience acquise pendant le projet.

Les informations personnelles recueillies feront l'objet d'un traitement de données informatisées pour les seuls besoins de l'étude anonymisée sur le devenir professionnel des personnes recrutées sur les projets ANR. Elles ne feront l'objet d'aucune cession et seront conservées par l'ANR pendant une durée maximale de 5 ans après la fin du projet concerné. Conformément à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée, relative à l'Informatique, aux Fichiers et aux Libertés, les personnes concernées disposent d'un droit d'accès, de rectification et de suppression des données personnelles les concernant. Les personnes concernées seront informées directement de ce droit lorsque leurs coordonnées sont renseignées. Elles peuvent exercer ce droit en s'adressant l'ANR (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/Contact>).

ANNEXE 1

Données supplémentaires – sous-projet 1 «Cartographie génétique »

C3. APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Nous avons développé la cartographie génétique par marqueurs SSR de 5 descendances sélectionnées selon 3 critères : 1) parents résistants d'origines géographiques et génétiques différentes (données CMB), 2) types de résistance diversifiés (complète ou partielle avec ou sans développement de stromas - voir partie C2-SP1) 3) disponibilité de données préliminaires confirmant la ségrégation de la résistance et 4) descendances de taille suffisante, disponibles en collection en début de projet (déclarées en « enabling technologies » mises à disposition du projet). Les descendances retenues (tableau 1) sont des descendances de première génération (F1) issues de croisements de type sensible x résistant, créées par pollinisation manuelle par le programme CMB. Ces descendances s'ajoutaient à 2 descendances présentes en Guyane et ayant fait l'objet de travaux de cartographie/QTL antérieurement au projet : 1) PB260xFX2784 (non publié) et PB260xRO38 dont les résultats avaient été publiés (Lespinasse et al. 2000a; Lespinasse et al. 2000b) pour laquelle nous prévoyions d'augmenter le nombre de descendants analysés (312 F1 supplémentaires). Au total, les résultats du projet devaient s'appuyer sur l'analyse de 7 descendances, issues de 5 géniteurs résistants, dont 5 descendances nouvellement analysées. Pour les descendances présentes à la fois au Brésil et en Guyane et permettant une analyse multi-locale, ils s'agissaient de descendants (individus) différents.

L'ADN de tous les descendants et parents a été extrait à partir de feuilles fraîches soit en Guyane soit à Montpellier pour le matériel du Brésil. La cartographie génétique a été réalisée principalement par marqueurs SSR (gSSR) complétés par des EST-SSR, issus du SP2, pour 3 descendances. Les gSSR ont été sélectionnés, d'après nos cartes de référence (données non montrées), pour une couverture optimum du génome en évitant de géotyper des marqueurs localisés au même endroit, et donc redondants. Nous avons ensuite complété les cartes avec les marqueurs EST-SSR produits par le SP2 afin de combler certains « trous » des cartes et de confirmer la position de ces marqueurs nouvellement développés. Le génotypage SSR et AFLP a été réalisé sur séquenceur Li-Cor et ABI 3500xl de la plate-forme de génotypage de l'UMR-dap au Cirad à Montpellier (Grand Plateau Technique Régional Languedoc-Roussillon). Pour 1 descendance (PB260xMDF180-Guyane) la carte a été densifiée par génotypage complémentaire en Li-Cor de marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

Les cartes ont été construites à l'aide du logiciel JoinMap4, suivant la stratégie du double pseudotestcross, méthode adaptée aux descendances issues de croisements entre parents hétérozygotes. L'hévéa est une espèce fortement allogame pour laquelle on ne dispose pas d'autre type de population de cartographie. Cette stratégie implique la construction de 3 cartes par descendances : 1 pour chaque parent et un 3^{ème} carte dite consensus ou synthétique, fusionnant les 2 cartes parentales. La synthèse des 2 cartes est réalisée grâce aux marqueurs hétérozygotes, *i.e.* cartographiés dans les 2 cartes parentales (marqueurs « ponts » ou « bridge markers »). La détection de QTL a été réalisée à l'aide du logiciel MapQTL5, adapté aux croisements entre hétérozygotes, d'abord sur les cartes parentales, puis sur les cartes consensus dans le cas où des QTL sont détectés chez les 2 parents pour un même caractère.

Tous les descendants ont été évalués individuellement pour la résistance à *Microcyclus* au champ, *i.e.* en conditions naturelles d'infestation. Deux descendances présentes en Guyane (tableau 1.1) ont été en plus évaluées en conditions d'inoculations contrôlées. Les inoculations sont réalisées par aspersion de spores de *M. ulei*, sur des plants élevés en chambre climatique (contrôle de la température et de l'éclairement, Lespinasse *et al.* 2000b). Les souches du champignon proviennent de la mycothèque du Cirad à Kourou. Les paramètres de résistance mesurés ont été définis par des études de phytopathologie et adaptés à l'analyse de grands effectifs (Lespinasse et al. 2000a; Le Guen et al. 2003) : il s'agit de notations, sur une échelle de 0 à 4, de l'intensité du développement de la phase sexuée du cycle de *M. ulei* (Densité de Stromas, DS) en conditions d'infestation naturelle, sur une échelle de 1 à 6 de l'intensité des nécroses, chloroses et de sporulations (Type de Réaction, TR ; phase asexuée) et de mesure quantitative du Diamètre des Lésions foliaires (DL) en inoculations contrôlées. Les descendances de Guyane ont été implantées dans des essais avec répétitions, avec 4 arbres par

descendants clonés par greffage. Au Brésil, les essais au champ étaient sans répétitions avec un seul arbre par descendant, issu de germination (seedlings). Dans tous les cas, les mesures ont été réalisées sur la totalité des arbres, par passages successifs (12 à 20) réalisés sur 2 à 4 ans. Les données utilisées ont été obtenues antérieurement au projet pour toutes les descendance et complétées par 12 passages successifs en 2009-2010, pour les descendance du Brésil. Les cartes ont été utilisées pour la détection de QTL sur les données d'évaluation de la résistance à *Microcyclus*, mais aussi sur des **évaluations supplémentaires, non prévues initialement**, de croissance en circonférence des arbres et de tolérance à une autre maladie foliaire (due au champignon *Colletotrichum gloeosporioides*), sur les descendance présentes au Brésil à PMB.

Les cartes ont été construites à l'aide du logiciel JoinMap4 (option CP) et les QTL à l'aide de MapQTL5 en utilisant un test non paramétrique (Kruskal-Wallis) et la cartographie par intervalle simple (Interval Mapping, IM) ou composite (Multiple QTL Model, MQM) fondées sur le maximum de vraisemblance (LOD score).

C4. RESULTATS OBTENUS

Tableau SP1.1 : Caractéristiques des cartes parentales construites à partir des 5 descendance : PB260xMDF180-Guyane (Combi), PB260xMDF180-Brazil (PMB), PB235xFDR5597-Brazil (PMB), PB260xFX2784-Guyane (Combi) et PB260xFX2784-Brazil (PEM)

Cartes parentales	Nombre de descendant s	Nombre de marqueurs dans les groupes de liaison (GL)					Nombre de GL ^b	Longueur de carte (cM)
		total	gSSR ^a	EST-SSR	AFLP	STS ^a		
FDR5597	200	219	183	36	-	-	18	1511
PB235	200	139	124	15	-	-	19	1353
PB260-Guyane	351	260 ^c	152	11 ^c	96	1	18	2648
MDF180-Guyane	351	267 ^c	157	14 ^c	95	1	18	2028
PB260-Brazil	171	124	93	31	-	-	18	1539
MDF180-Brazil	171	184	117	67	-	-	18	1638
FX2784-Guyane								
^a	125	7	7	-	-	-	1 (g2)	35
FX2784-Brazil	295	11	11	-	-	-	1 (g2)	78

^a carte et type de marqueurs développés antérieurement au projet (déclarés comme "enabling technologies")

^b le génome de l'hévéa est à 2n=2x=36 chromosomes : le nombre de GL attendu est de 18 (Lespinasse et al. 2000b)

^c données nouvelles par rapport à la carte publiée dans (Le Guen et al. 2011).

« - » : non appliqué

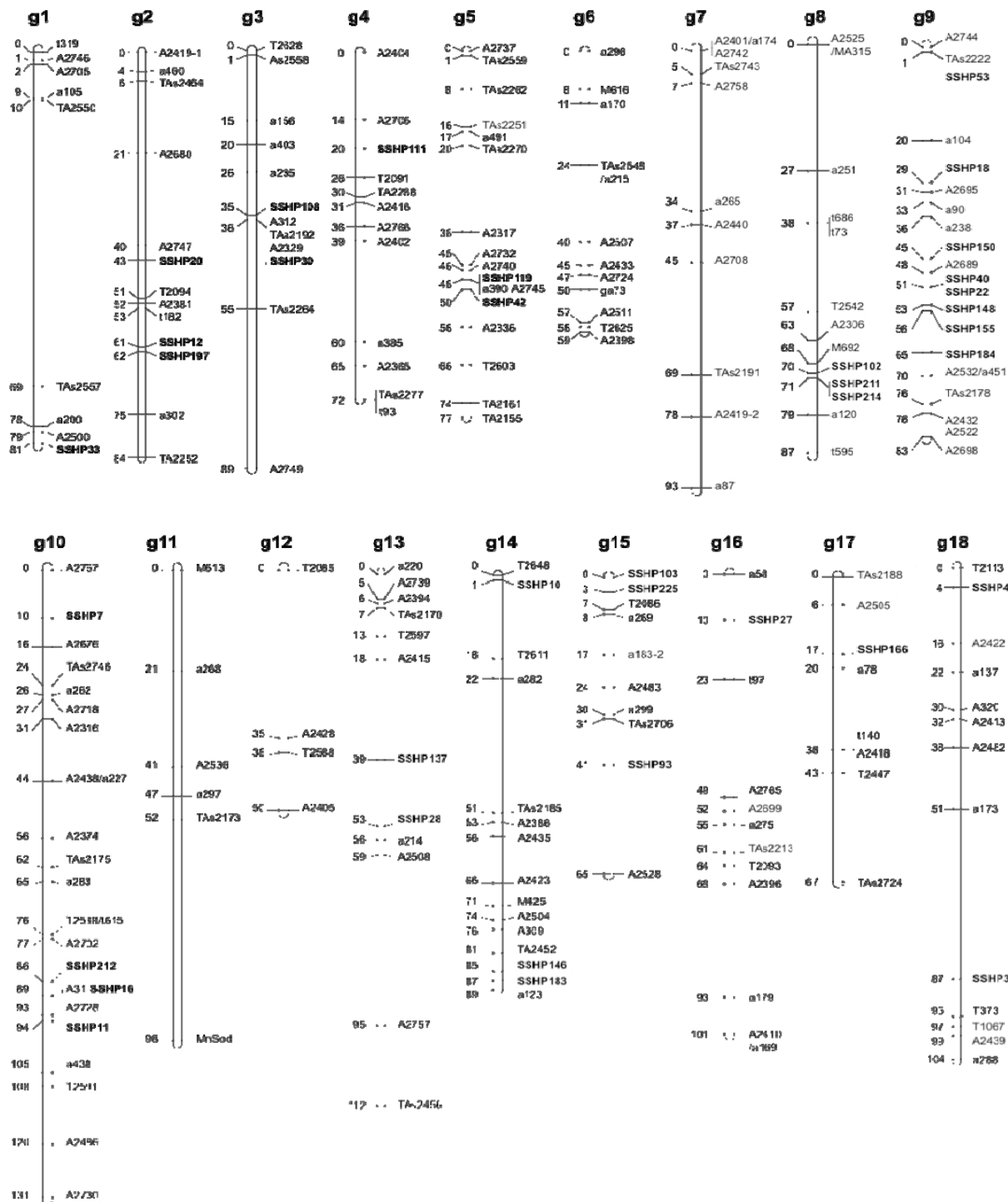


Figure SP1.1: Carte génétique de FDR5597 comprenant 218 locus SSR dont 36 EST-SSR issus des banques SSH (SSH# en gras).

Tableau SP1.2 : QTL détectés au champ chez MDF180 et FDR5597, par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, par « Interval Mapping » (IM) ou par « Multiple QTL Model » (MQM), pour les caractères densité de stromas (DS) et type de réaction (TR) pour la résistance à *Microcyclus*, tolérance à *Colletotrichum gloeosporioides* (Col) et croissance en circonférence (Cir). Le seuil de signification en IM et MQM a été déterminé par tests de permutations (LOD 3,0 pour toutes les conditions).

permutations (ESD 5%) pour toutes les combinaisons).										
Caractère	GL	Marqueur ^a	Position ^b	Kruskal-Wallis ^c		IM		MQM		
				K	P	LOD ^d	R ² (%) ^e	LOD ^d	R ² (%) ^e	Co-facteur ^f
<i>MDF180-Guyane (d'après Le Guen et al. 2011)</i>										
DS	g1	a134	0,0	10,3	<0,005	1,8	2,9	4,6	1,1	T2086
	g14	M124 ⁽¹⁾	0,0	8,0	<0,005	1,2	1,9	3,3	0,9	T2086
	g15	T2086	+1,0	181,7	<0,0001	147,3	91,6	-	-	-
TR	g15	T2086	+1,0	168,5	<0,0001	86,9	80,1	-	-	-
<i>MDF180-Brésil</i>										
DS	g14	a282 ⁽¹⁾	+15,4	ns	ns	ns	-	3,5	14	a289
	g15	a289	+3,0	16	<0,0001	4,3	12,6	-	-	-
TR	g15	a289 ⁽²⁾	0,0	12	<0,0005	2,8	7,6	-	-	-
Col	g3	SSH113	+3,0	ns	ns	3,4	14,5	-	-	-
Cir	g1	a200	+5,0	11,3	0,001	3,1	14,6	-	-	-
<i>FDR5597-Brésil</i>										
DS	g14	T2611 ⁽¹⁾	-7,6	100,5	<0,0001	40,6	61,9	-	-	-
	g9	A2698	0,0	15,2	0,0005	ns	-	3,3	4,6	T2611
TR	g14	T2611 ⁽¹⁾	-7,6	70,2	<0,0001	23,6	40,9	-	-	-
Cir	g14	T2611 ⁽¹⁾	-7,6	91,0	<0,0001	27,2	44,7	-	-	-
	g1	a200	0,0	ns	ns	ns	-	3,4	3,9	T2611

⁽¹⁾ marqueurs correspondants au même locus ⇔ même QTL

⁽²⁾ QTL putatif à la limite du seuil de signification, mais trouvé significatif pour un autre caractère (DS)

^a Marker avec la plus forte valeur de K ou le plus proche de la valeur de LOD la plus élevée (pic de LOD)

^b Position du pic de LOD par rapport au marqueur le plus proche, en centi-Morgan

^c Résultat du test non paramétrique, comparable à un Chi² à 1 degré de liberté (K) et valeur de probabilité associée (P)

^d Résultat du test de vraisemblance (LOD score) et ^epourcentage de variance expliquée par le QTL

^f Marqueur utilisé comme co-facteur dans le test MQM

ns : non significatif ; « - » : non appliqué

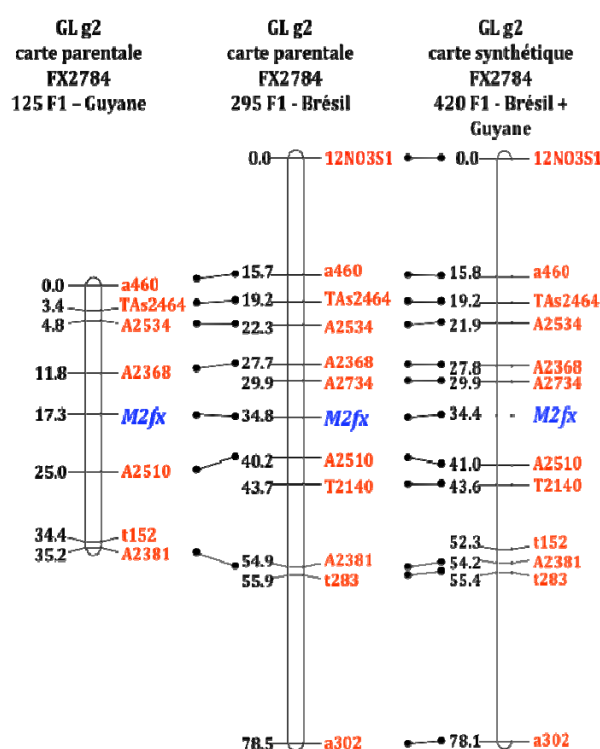


Figure SP1.2 : Cartes du GL g2 comprenant 12 gSSR et le gène majeur de résistance à *M. ulei* *M2fx* détecté chez FX2784. Cartes parentales construites indépendamment sur les descendants PB260xFX2784 de Guyane ou du Brésil

Détection de QTL en conditions contrôlées

Antérieurement au projet GENESALB, la descendance PB260xMDF180-Guyane a été évaluée en conditions d'inoculations contrôlées à l'aide de 3 souches isolées de *M. ulei* conservées dans la mycothèque du Cirad en Guyane (Kourou) : 1 souche guyanaise (CB101) prélevée sur la station expérimentale de Combi et 2 souches brésiliennes (FTP39 et PMB23.1) prélevées sur la plantation PMB (Bahia, Brésil). Les mesures de résistance ont été faites 11 jours après inoculation. Les inoculations ont été répétées 2 fois pour toutes les souches et tous les descendants.

Les résultats de détection de QTL pour ces 3 souches sont présentés tableau SP1.3. Comme pour la résistance au champ, le déterminisme de la résistance vis-à-vis de souches isolées apparaît gouverné principalement par un facteur génétique majeur (QTL avec un LOD score > 40) expliquant jusqu'à 77% de la variance. Pour la souche guyanaise le QTL est sur le GL g15 et colocalise avec le gène majeur *M15md* détecté chez MDF180 au champ (Le Guen *et al.* 2011 ; voir tableau SP1.2). Pour les 2 souches brésiliennes il s'agit d'un QTL en g13, différent du gène majeur *M13-1bn* de RO38 (Le Guen *et al.* 2003). Bien que très efficace contre des souches brésiliennes, ce QTL en g13 n'a pas été détecté sur la descendance du même croisement PB260xMDF180 au Brésil (tableaux 2 et SP1.2).

Il avait été programmé des inoculations avec une quatrième souche, afin de confirmer l'éventuelle spécificité de ces QTL majeurs. Ces inoculations ont bien été réalisées sur la descendance complète, mais probablement en raison d'une erreur d'identification de la souche utilisée, les paramètres de résistance (LD et RT) ségrégeaient peu et aucun QTL significatif n'a été détecté.

Les inoculations d'une 2^{ème} descendance de Guyane (PB260xRO38-sup, tableau 1) sont en cours de finalisation et les données seront analysées au cours du 2^{ème} trimestre 2011.

Tableau SP1.3 : QTL de résistance à *Microcyclus* détectés chez MDF180 en conditions d'inoculations contrôlées avec 3 souches isolées de *M. ulei*. FTP39 et PMB23.1 : souches brésiliennes (origine PMB, Bahia) ; CB101 : souche guyanaise (origine Combi). Paramètres mesurés : diamètre des lésions foliaires (DL) et type de réaction (TR). Le seuil de signification en Interval Mapping (IM) et Multiple QTL Model (MQM) a été déterminé par tests de permutations (LOD 3,0).

			Kruskal Wallis ^c		IM		MQM			
Caractère	GL	Marqueur ^a	Position b	K	P	LOD ^d	R ² (%) ^e	LOD ^d	R ² (%) ^e	Co- facteur ^f
<u>FTP39</u>										
RT	g10	a31	-0,5	12,8	<0,0005	2,7	6,4	3,4	7,7	T2086
	g13	A2757	-7,0	92,9	<0,0001	42,2	73,8	43,3	67,7	T2086
	g14	TA2545	0,0	9,1	<0,005	1,9	4,6	3,3	5,3	T2086
	g15	T2086 ⁽¹⁾	0,0	20,7	<0,0001	4,3	9,9	5,6	6,2	A2757
LD	g13	A2757	7,0	94,2	<0,0001	32,3	64,4	31,9	59,4	T2086
	g15	a289 ⁽¹⁾	0,0	18,4	<0,0001	3,4	8,0	3,7	4,6	A2757
<u>PMB23.1</u>										
RT	g13	A2757	-7,0	94,2	<0,0001	43,7	76,8	42,1	68,5	T2086
	g15	T2086 ⁽¹⁾	0,0	17,3	<0,0001	3,8	8,9	5,1	5,2	A2757
LD	g13	A2757	-7,0	91,8	<0,0001	33,5	67,7	32,0	60,3	T2086
	g15	a289 ⁽¹⁾	0,0	17,0	<0,0001	3,4	8,0	3,6	4,5	A2757
<u>CB101</u>										
RT	g15	T2086 ⁽¹⁾	+1,0	109	<0,0001	44,7	67,1	44,3	65,7	A2757
LD	g15	a289 ⁽¹⁾	0,0	40,7	<0,0001	9,5	20,7	9,1	19,5	A2757

⁽¹⁾ ces 2 marqueurs correspondent au même locus (même QTL) et au locus du gène majeur *M15md* (tableau SP1.2)

^a Marker avec la plus forte valeur de K ou le plus proche de la valeur de LOD la plus élevée (pic de LOD)

^b Position du pic de LOD par rapport au marqueur le plus proche, en centi-Morgan

^c Résultat du test non paramétrique, comparable à un Chi² à 1 degré de liberté (K) et valeur de probabilité associée (P)

^d Résultat du test de vraisemblance (LOD score) et ^epourcentage de variance expliquée par le QTL

^f Marqueur utilisé comme co-facteur dans le test MQM

ANNEXE 2

Informations supplémentaires, sous-projet 2 « Développement de marqueurs »

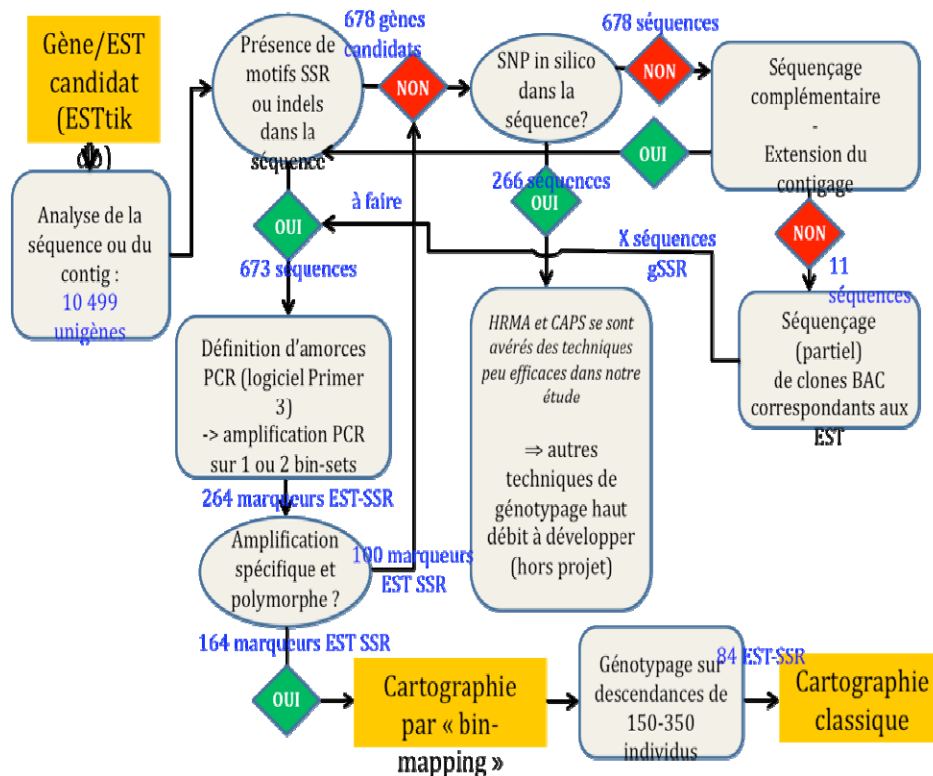


Figure SP2.1 : « Workflow » de recherche de marqueurs pour la cartographie de gènes candidats, appliqué dans le projet. Les unigènes issus d'ESTtik résultent de l'assemblage des unigènes d'EST-SSH avec les autres sources d'EST d'hévéa (EMBL-Genbank et P. Montoro com. pers.). Les 678 gènes candidats analysés étaient issus d'une première analyse d'expression par macro-arrays. Ce nombre a été réduit par la suite à 489 comme indiqué dans le compte-rendu.

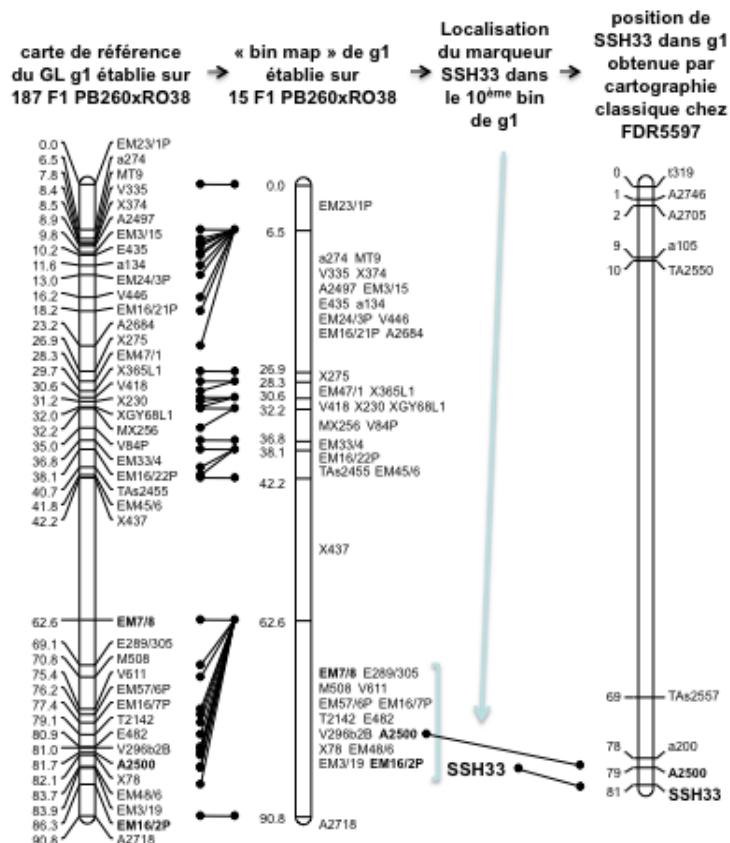


Figure SP2.2 : Illustration de l'efficacité de la cartographie sélective (bin-mapping) : localisation du marqueur EST-SSR SSH33 dans la bin-map de RO38 et confirmation de la position par cartographie sur la descendance complète de FDR5597.

Recherche de marqueurs SNP dans les gènes candidats :

C4. RESULTATS OBTENUS

Un sous ensemble de 678 unigènes (gènes candidats) avait été identifié par le SP3, après une première analyse des résultats des macro-arrays et ajout d'un certain nombre de gènes d'intérêt particulier, tels que des analogues de gènes de résistance (Resistance Gene Analogues, Rga ou Gènes-R). Nous avons testé la présence de SNP par une technique de détection des polymorphismes basée sur l'analyse des courbes de fusion des produits PCR. Cette technique permet de distinguer des génotypes qui présentent un décalage significatif dans leur courbe de fusion du à des polymorphismes de séquences (technique dite de HRMA pour High Resolution Melting Analysis). Une phase de mise au point sur quelques paires d'amorces a été initiée et a permis d'optimiser le protocole. Parmi les 678 gènes candidats, 31 contenaient des motifs microsatellites. Parmi ces 31, 23 ont pu faire l'objet d'un design d'amorces soit automatique soit manuel en relâchant certaines contraintes.

Sur l'ensemble des 678 candidats, 266 correspondent à des contigs de 2 séquences ou plus d'EST-SSH et 412 à des singletons. Une recherche de SNP *in silico* a été effectuée, à l'aide du pipeline ESTtik, à partir des alignements de séquences dans les contigs. Seuls les contigs présentant un nombre suffisant de séquences chevauchantes permettent de valider la présence d'un SNP. Nous avons néanmoins pu identifier 62 unigènes présentant au moins un SNP.

Quatorze couples d'amorces ont été définis spécifiquement pour le génotypage de SNP par HRMA et les tests d'amplification et de polymorphisme ont été réalisés sur le même échantillon de génotypes que pour les EST-SSR. A ce jour 42 autres couples d'amorces restent à tester. Sur les 14 couples, 11 ont donné un produit d'amplification spécifique et 7 (50%) ont présenté des groupes possédant des profils de courbes de fusion différents correspondant potentiellement à des allèles différents. Deux de ces marqueurs ont été génotypés sur descendances complètes et il est apparu que la distinction entre les allèles aux SNP n'était pas assez nette et générait un risque élevé d'erreurs de génotypage. De ce fait ces 2 marqueurs SNP n'ont pu être cartographiés.

Séquençage de clones BAC d'hévéa pour la recherche de marqueurs gSSR dans des zones cibles et le clonage d'analogue de gènes de résistance (Rga) :

C3. APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Un ensemble de 42 clones BAC, issus de la banque BAC hévéa du Cirad, avaient été identifiés par hybridation sur membranes haute densité, comme correspondant à des régions chromosomiques d'intérêt pour la résistance à *Microcyclus* (Seguin et al. 2006). Ces clones BAC se répartissent en 2 catégories, une première regroupant des clones contenant des Rga de type NBS-LRR, une autre comprenant des clones BAC choisis car contenant une sonde proche du majeur de résistance à *Microcyclus* M13-1bn (Le Guen et al. 2003). Des séquences d'extrémités de ces clones BAC avaient été produites (EMBL accession numbers: DQ115593 à DQ115640) pour l'identification de marqueurs gSSR. Ces séquences partielles n'avaient pas permis d'identifier suffisamment de marqueurs et nous avons entrepris le séquençage complet des mêmes clones BAC. Cette étude nous permettra de densifier le marquage de zones d'intérêt, d'initier une réflexion sur le séquençage de l'hévéa grâce notamment à un effort d'annotation à réaliser et d'essayer d'appréhender l'organisation des analogues de gènes de résistances chez cette espèce.

C4. RESULTATS OBTENUS

Un premier lot de 21 clones BAC a été séquencé en 2010 en sous-traitance (GATC-Biotech, Constance, Allemagne et Beckman-Coulter-Genomics, Danver, MA, USA).

Nous avons choisi de tester 2 protocoles de séquençage reposant tous deux sur les nouvelles technologies de séquençage (GS-Flx, Roche 454 Titanium), l'un ne comprenant qu'une étape dite de « shot-gun », la seconde, plus coûteuse, faisant appel à la construction de banques « paired-end ». Cette seconde solution s'est avérée plus efficace dans le cadre d'un séquençage de novo avec un certain

nombre de BAC totalement résolus malgré la présence d'une importante contamination par de l'ADN bactérien.

Nous avons pu confirmer que les clones BAC séquencés correspondaient bien à la sonde cible (pas de faux positifs) pour 16 des 21 clones BAC, par blast des sondes ou des séquences d'extrémités de BAC correspondantes (Seguin et al. 2006). Les 5 clones restant n'ont pas pu être validés par défaut de sonde ou bien à cause d'un manque de couverture de séquençage.

Un deuxième échantillon de 20 clones BAC correspondant aux mêmes sondes/locus est en cours de séquençage (GS-Flx). Les séquences seront livrées fin Mars 2011. L'analyse de séquences de BAC (assemblage, annotation, identification de séquences complètes de Rga et identification de SSR) devra être finalisée avec l'appui d'un bio-informaticien.

ANNEXE 3

Compte-rendu plus détaillé, sous-projet 3 « Gènes candidats »

C3. APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Matériel végétal

Les plants greffés ont été élevés au Brésil (Plantation Michelin de Bahia, Ituberá) pour les génotypes MDF180 (résistance partielle stable) et PB314 (sensible) et en Guyane (Kourou, France) pour les génotypes RO38 (résistance contournée) et PB260 (sensible). La face inférieure des feuilles (stade B2) des plants a été inoculée suivant le même protocole sur les deux stations expérimentales, avec une suspension à 2×10^5 conidies/mL (Mattos et al. 2003). Le succès de chaque infection a été vérifié 12 jours après inoculation (ai) par l'évaluation visuelle des symptômes.

Les folioles inoculées et non-inoculées ont été collectées à différents temps après inoculation (ai) : à 6, 12, 24, 48, 72, 96 h ai puis tous les 6 j jusqu'à 58 j ai pour les génotypes MDF180 et PB314 ; à 6, 12, 24, 48 et 96 h ai, pour les génotypes RO38 et PB260.

Construction des banques différentielles

Des banques différentielles de type SSH (Suppressive Subtractive Hybridization) ont été construites pour répondre à deux objectifs : 1. Isoler les transcrits surexprimés à différentes phases du processus infectieux (MDF180 et PB314) ; 2. Isoler les transcrits sur- et sous-exprimés au cours des phases précoces de l'infection (RO38 et PB260).

Les ARN de chaque échantillon ont été extraits avec le réactif Concert™ Plant RNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) puis regroupés de la façon suivante :

- En trois lots correspondant aux phases précoces (de 6 à 72 h ai), intermédiaires (de 4 à 28 j ai) chez MDF180 et PB314) et tardives (de 34 à 58 j ai chez PB314) de l'infection, pour chacun des clones MDF180 et PB314
- En un seul lot correspondant aux phases précoces de l'infection (de 12 à 96 h ai) pour chacun des clones RO38 et PB260

Les extraits issus de feuilles témoin non-inoculées ont été regroupés de la même façon.

Séquençage et analyse bioinformatique

Les banques MDF180 et PB314 ont été séquencées à l'Université de Santa Cruz (Ilhéus, Bahia) avec un séquenceur capillaire MegaBACE™ 1000 (Amersham Biosciences). Les banques RO38 et PB260 ont été séquencées par sous-traitance à la société GATC Biotech. Le pipeline ESTtik (<http://esttik.cirad.fr>) ; (Argout et al. 2008)) a été utilisé pour le nettoyage des séquences, l'assemblage des contigs et l'annotation

3.4. Macro-arrays

Après assemblage des contigs, des « sets unigènes » constitués des singletons et d'une séquence représentative de chaque contig (la plus longue) ont été définis pour chaque banque. Pour chaque « set unigènes », les ESTs ont été amplifiés par PCR et spottés sur membranes de nylon, à haute densité. Au final, 8 sets unigènes ont été déposés sur membrane correspondant aux banques SSH1, SSH2, SSH3, SSH4, SSHA, SSHB, SSHE et SSHF (tableau SP3.1). Les membranes ont été hybridées au CIRAD à Montpellier (UMR-dap) avec des cibles radio-marquées (P^{33} -cDNAs) comme indiqué dans le tableau SP3.1. Les hybridations et leur analyse ont été menées indépendamment pour les couples MDF180 / PB314 et RO38 / PB260.

Tableau SP3.1. : Constitution des membranes réalisées pour les hybridations (macro-arrays).

Sondes (membranes)	Cibles cDNA			
	MDF180	PB314	RO38	PB260
SSH1	Lésions foliaires:	Lésions foliaires:	–	–
SSH2	- jeunes	- jeunes		
SSH3	- intermédiaires	- intermédiaires		
SSH4	- âgées	- âgées		
SSHA	–	–	Folioles inoculées et non-	Folioles inoculées et non-
SSHB			inoculées à 24, 48 et 96 h	inoculées à 24, 48 et 96 h
SSHE			ai	ai
SSHF				

A partir des données brutes d'hybridation, une méthode de normalisation non paramétrique et dépendante de l'intensité basée sur l'identification d'un groupe de gènes *self-consistent* (*self-*

consistent set ; SCS) a été utilisée (Dawes and Glassey 2007). Le SCS représente tous les gènes dont l'expression est constante quelques soient les conditions testées (avec ou sans inoculation par *M. ulei*, âge de la lésion, génotype). Les taux d'expression de chaque gène (exprimé en log2) ont ainsi été normalisés et statistiquement analysés (ANOVA) de façon à supprimer les gènes dont l'expression présentait une grande variabilité entre répétition. Les effets génotypes, temps ai, motif inoculé / non-inoculé et leur interactions ont été analysés. Seuls les gènes présentant une différence d'expression significative à 0.01% pour au moins un des effets, ont été retenus. A partir des moyennes des expressions, les ratios infecté : sain et résistant : sensible ont été calculés et les gènes présentant des ratios d'expression relative inférieurs ou égaux à -2 et supérieurs ou égaux à 2 pour au moins 1 des temps après inoculation ont été sélectionnés. Le regroupement en cluster des gènes présentant le même profil d'expression a été obtenu grâce au programme *CLUSTER package analysis* (Eisen et al. 1998) et visualisé grâce au programme *TreeView*.

Etude d'expression par RT-qPCR

Une sélection d'EST-SSH choisies d'après leurs homologues de séquence a été analysée par RT-PCR en temps réel, afin de préciser leur différentiel d'expression lors de l'interaction *Hevea* / *Mycrocyclus*.

Sur le couple PB260 / R038, l'analyse a été réalisée à 6, 12, 24, 48 et 96 h ai, avec la souche CCGE 1.2.01 (la souche initialement utilisée pour la construction des banques ayant été perdue).

Sur le MDF180 et PB314, une analyse préliminaire a été réalisée à 12, 24, 48, 96 h ai et 10 j ai avec la souche FTP39 (souche utilisée pour la détection de QTL chez MDF180-Guyane).

Les cDNA, synthétisés à partir d'1 µg d'ARN soigneusement traités à la DNase, ont été amplifiés en thermocycleur (BioRad iQ5) en présence de SYBR-Green pour la détection en temps réel des produits d'amplification. L'expression des gènes cibles a été normalisée par rapport à l'expression d'un gène de référence d'actine. L'expression relative (motif inoculé vs non inoculé) a été calculée selon le model d'analyse de Pfaffl et validée par un test statistique (ANOVA, P>95%) à partir de 3 répétitions (3 extractions d'ARN indépendantes). Pour le couple MDF180/PB314, l'analyse reste préliminaire en l'absence de répétitions biologiques et donc de validation statistique.

C4. RESULTATS OBTENUS

Banques d'EST

Onze banques ont été construites. Le détail de chaque banque est fourni dans le tableau SP3.2. L'assemblage en contig de la totalité des séquences brutes (reads) a permis d'identifier 5509 singletons et 1349 contigs, soit un set de 6858 EST. En raison d'un grand nombre de séquences présentant des homologues pour des fonctions non connues (après utilisation de la version initiale du pipeline ESTtik, CIRAD), une nouvelle annotation des séquences est en cours utilisant plusieurs bases de données (protéome d'*Arabidopsis*, SwissProt+EMBL, NR Genbank et NT). Cette annotation nous permettra de faire une interprétation fonctionnelle des groupes de gènes associés à la réponse à l'infection chez PB260, PB314, R038 et MDF180.

Tableau SP3.2 : descriptif des banques SSH produites dans le projet

Banque	Combinaison soustractive (tester vs driver)	Temps	Expression attendue du clone EST pendant l'infection
SSH1	MDF180 inoculé vs MDF180 non-inoculé	6 à 72 h ai	↑ MDF180
SSH2	PB314 inoculé vs MDF180 non-inoculé	6 à 72 h ai	↑ PB314
SSH3	MDF180 inoculé vs MDF180 non-inoculé	4 à 28 j ai	↑ MDF180
SSH4	PB314 inoculé vs MDF180 non-inoculé	4 à 28 j ai	↑ PB314
SSH5	PB314 inoculé vs MDF180 non-inoculé	34 à 58 j ai	↑ PB314
SSHA	PB260 inoculé vs R038 inoculé	12 à 96 h ai	PB260 > R038
SSHB	R038 inoculé vs PB260 inoculé	12 à 96 h ai	R038 > PB260
SSHC	PB260 inoculé vs PB260 non-inoculé	12 à 96 h ai	↑ PB260
SSHD	PB260 non-inoculé vs PB260 inoculé	12 à 96 h ai	↓ PB260
SSHE	R038 inoculé vs R038 non-inoculé	12 à 96 h ai	↑ R038
SSHF	R038 non-inoculé vs R038 inoculé	12 à 96 h ai	↓ R038

La comparaison des banques SSH, construites à partir de feuilles infectées entre 6 h ai et 4 j ai (Fig. SP3.1) chez les 4 génotypes, révèle un faible nombre de séquences identiques à 2, 3 ou 4 banques. Une analyse plus fine de quelques gènes cibles (sélectionnés sur leur fonction) permettrait d'identifier les causes de ces différences : différents fragments d'un même gène dans des banques différentes, allèles, paramétrage de l'assemblage...

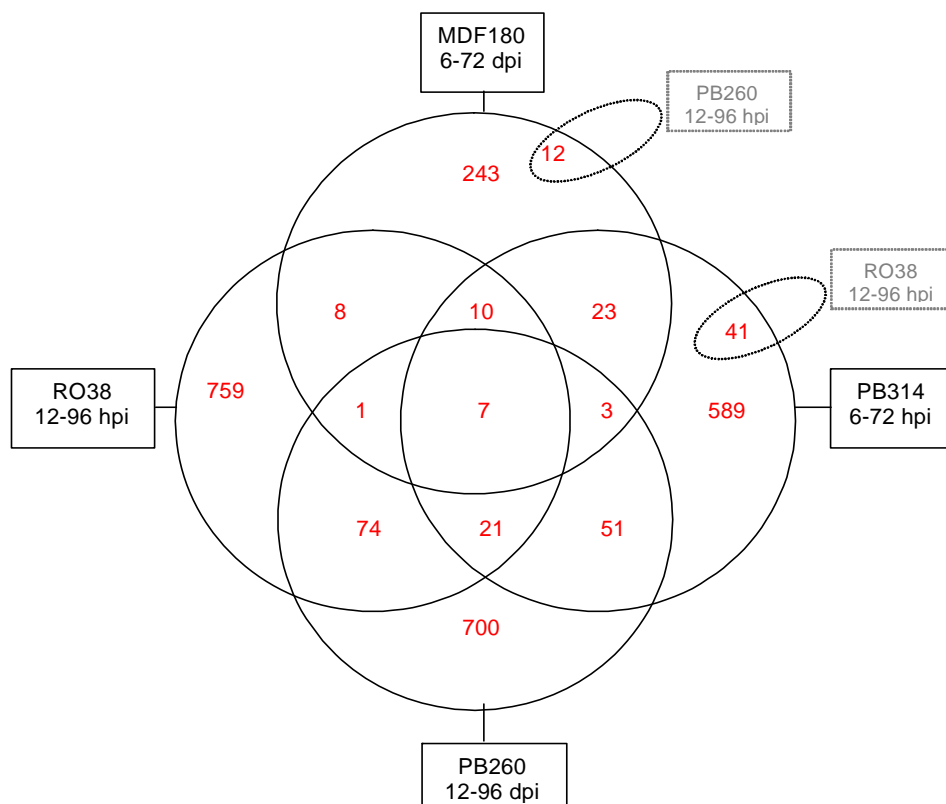


Figure SP3.1 : Comparaison des banques SSH1, SSH2, SSHE, SSHC correspondant à des gènes potentiellement surexprimés entre 6 et 96 heures chez MDF180, PB314, PB260 et RO38. La comparaison a été établie à partir des résultats de l'assemblage en contigs de l'ensemble des séquences brutes (reads) des 11 banques SSH.

3.2. Sélection de gènes candidats

Résultats d'analyse d'expression des EST-SSH issues des banques PB314 vs MDF180 (UESC).

Trois cent douze gènes dont le ratio du niveau d'expression était supérieur à 2 ou inférieur à -2, entre au moins 2 traitements, ont été considérés comme gènes candidats, différentiellement exprimés. L'analyse par le programme CLUSTER a révélé 12 groupes (ou clusters) de gènes (Fig. SP3.2). Les clusters I, II, III, IV et V comprennent 169 gènes (54.5%) surexprimés dans les jeunes lésions de MDF180, suivi d'une réduction du nombre de transcrits comparativement aux lésions de PB314. Les cluster VI et VII sont composés de 32 gènes (10%) et se caractérisent par une augmentation d'expression dans la phase intermédiaire de l'infection chez MDF180. Le cluster VIII regroupe 25 gènes (8%) surexprimés chez PB314 dans la phase tardive d'infection. Les clusters IX et X comprennent respectivement 15 et 32 gènes (5 et 10%) surexprimés dans la phase précoce ou intermédiaire chez PB314. Les cluster XI et XII sont constitués de 39 gènes (12.5%) induits dans la phase tardive ou précoce chez MDF180 et dans la phase intermédiaire chez PB314.

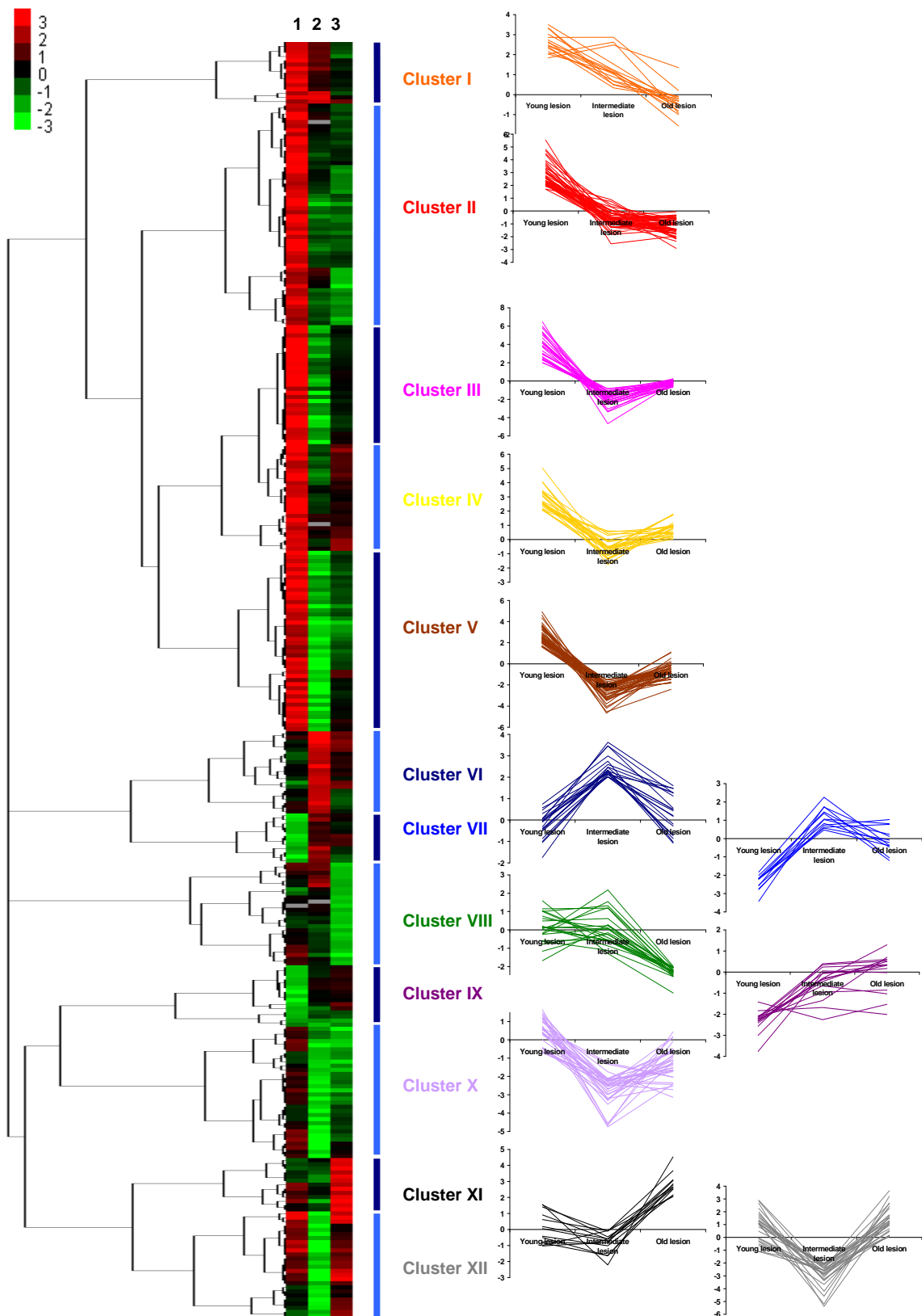


Figure SP3.2 : Dendrogramme des profils d'expression des gènes différentiellement exprimés entre MDF180 et PB314 au cours du développement de la lésion foliaire. Lésions foliaires jeunes (1), intermédiaires (2), âgées (3).

Les analyses d'expression par macro-arrays ont conduit à l'identification d'un set de 177 gènes candidats différentiellement exprimés au cours de l'infection chez PB260 ou RO38 (Fig. 2). Les répétitions ont été intégrées dans l'analyse pour une sélection plus rigoureuse des gènes différentiellement exprimés. Les 177 gènes identifiés sont sur- ou sous-exprimés de façon distincte entre génotypes, mais aussi de façon différentielle au cours du temps après infection (Fig. 2). Les gènes surexprimés uniquement chez RO38 sont au nombre de 27, et les sous-exprimés au nombre de 17, contre 54 surexprimés et 62 sous-exprimés chez PB260. Par ailleurs, on trouve 7 gènes à la fois sous-exprimés chez RO38 et surexprimés chez PB260. Inversement, 4 gènes sont surexprimés chez RO38 et sous-exprimés chez PB260.

Au niveau fonctionnel, globalement, il apparaît une induction plus importante du nombre de gènes chez le génotype sensible PB260, probablement, en partie liée à une invasion mycélienne des tissus 96 h ai. Dans le même sens, on constate une inhibition de 27 gènes chez P260 dès 48 ai, alors que seulement trois sont réprimés chez RO38. Avec l'annotation de ces gènes réalisée à partir de Blast sur différentes bases de données, une analyse fonctionnelle des voies induites ou réprimées par l'infection sera faite. Au total, ce sont donc $312 + 177 = 489$ gènes candidats pour lesquels des marqueurs génétiques devraient être développés pour leur intégration dans les cartes génétiques.

3.3. Validation par PCR en temps réel de l'expression de quelques gènes candidats

Une sélection d'EST-SSH correspondant à sept gènes de défense (Glucanase, Chitinase, Peroxydase, ACC oxydase, Défensine, Glutathion S-transférase, Hévamine) et sept homologues de gènes de résistance (gènes R) comportant un domaine LRR (Leucine Rich Repeat) a été analysée par RT-PCR en temps réel, en cinétique post-inoculation (point-par-point), sur le couple PB260-RO38, et de manière plus préliminaire sur le couple PB314-MDF180. Le tableau SP3.3 récapitule les résultats d'expression relative obtenus (inoculé vs non inoculé). La figure SP3.4 illustre le résultat obtenu pour le gène E42. Les autres résultats, non montrés ici, sont fournis dans le rapport de master d'E. Goujon (2010).

Tableau SP3.3 : Bilan des gènes modulés par l'inoculation.

EST-SSH		PB260 / RO38*			PB314 / MDF180**		
		Cinétique : 6, 12, 24, 48 et 96h pi			Cinétique : 12, 24, 48, 96 h et 10 j pi		
		Souche CCGE 1.2.01			Souche FTP 39		
		Pic d'induction (temps pi)	Qr max	Accession	Pic d'induction (temps pi)	Qr max	Accession
E42	Gène R	6 h	4,9	RO38		0	
E132	Gène R	24 h	26	PB260		Na	
E23	Gène R		0			Na	
E51	Gène R		0			Na	
E61	Gène R		0			Na	
E92	Gène R		0			Na	
E102	Gène R		0			Na	
Gluc	Glucanase	6 h	5,2	RO38	500	10 j	MDF180
Hb-P1	Peroxydase	6 h	6,3	RO38		0	
P45	ACO	24 et 48 h	17	PB260		0	
Def	Défensine		0		2,5	12 h	MDF180
					2,9	24 h	PB260
Chit	Chitinase		0		24	24 h	MDF180
					12 et 14	24 h et 10j	PB314
Hev	Hevamine		0			0	
GST	Glutathion S-transférase		0			0	

Qr : Expression relative (inoculé vs non inoculé) normalisée par rapport à l'actine.

* Résultats confirmés statistiquement, sur 3 répétitions (ANOVA Tukey HSD, $P > 95\%$)

** Données indicatives (pas de répétition). Donnée manquante pour MDF180 à 96h pi.

Na : non analysé ; 0 : pas de modification d'expression significative.

Parmi les 7 homologues de gènes de résistance testés, seul deux ont montré des variations d'expression relative significatives. Le gène E42 (Fig. SP3.5) présente une surexpression significative au temps 6 h ai, chez le clone résistant uniquement (RO38). Aucune variation significative n'a été observée sur le couple PB314/MDF180, mais il faut souligner que les conditions expérimentales (cinétique et souche) sont différentes de celles du couple PB260/RO38.

Expression relative (Qr)

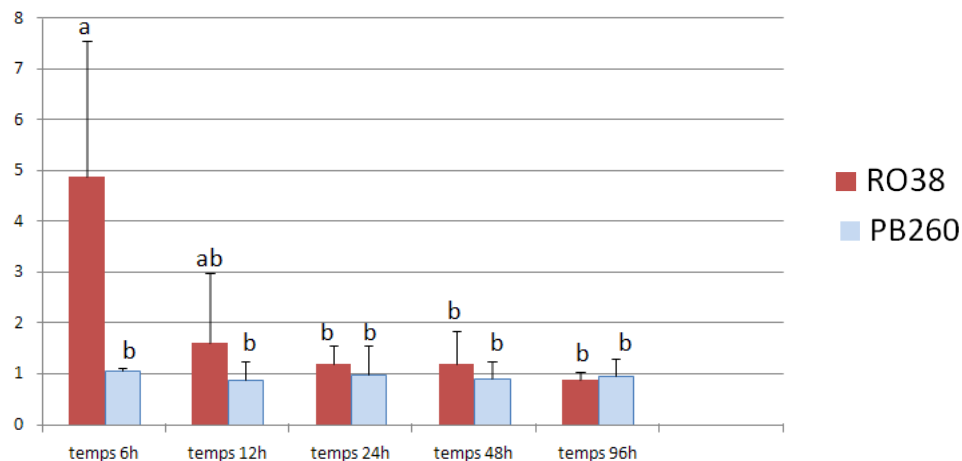


Figure SP3.4 : Expression relative du gène NBS-LRR E42 en réponse à l'inoculation chez RO38 (tolérant) et PB260 (sensible), au temps de cinétique 6, 12, 24, 48 et 96 h post-inoculation avec la souche CCGE 1.2.01. Test statistique réalisé sur 3 répétitions (ANOVA, test de Tuckey), avec un intervalle de confiance de 99%.

Le gène E132 est quant à lui surexprimé au temps 24 h, mais uniquement chez le clone sensible PB260. Une cinquantaine d'EST homologues de gènes de résistance disponibles dans nos banques différentielles restent encore à analyser.

En ce qui concerne les gènes de défense, une surexpression au temps 6 h a été observée, chez le clone résistant uniquement, pour les gènes de peroxydase et b-1,3 glucanase. Le gène d'ACC oxydase présente une augmentation d'expression relative aux points 24 et 48 h pour le clone PB260, qui pourrait être due à une dé-répression de l'expression du gène chez le clone sensible suite à l'inoculation. Plusieurs gènes (b-1,3 glucanase, chitinase) ont montré une surexpression très significative à 10 j ai (ce qui correspond à la période de sporulation), et supérieure chez le clone tolérant MDF180 comparativement au sensible PB314.

C5. DISCUSSION

Conformément aux objectifs initiaux, un large groupe d'EST différentiellement exprimés a été produit à partir de différentes sources de résistances/sensibilité. Les EST-SSH obtenues constituent une ressource moléculaire nouvelle qui pourra être exploitée pour l'analyse fonctionnelle de voies métaboliques spécifiques, en particulier pour la réponse aux stress biotiques. Ces ressources moléculaires ont d'ores et déjà servi au développement de marqueurs EST-SSR et à l'identification de SNP chez l'hévéa.

Une meilleure annotation des séquences par comparaison avec plusieurs bases de données et l'analyse intégrative des fonctions associées aux gènes induits ou inhibés par l'infection permettra une première interprétation des voies induites ou réprimées par l'infection dans les différents génotypes et une meilleure sélection des gènes candidats pour des études fines d'expression. L'analyse par RT-PCR de quelques EST-SSH choisis d'après leurs homologues de séquence a permis de confirmer leur différentiel d'expression entre résistant et sensible, et donc de valider la démarche « SSH » pour l'identification de gènes candidats impliqués dans la tolérance à *Microcyclus*. Pour d'autres, l'absence de différentiel d'expression en RT-qPCR peut s'expliquer par différentes contraintes techniques telles

que l'utilisation de souches différentes pour la construction des banques SSH et pour la validation en qPCR, ou la forte variabilité d'une inoculation à une autre, qui nécessiterait un plus grand nombre de répétitions biologiques. La validation par qPCR devra être élargie aux EST-SSH sélectionnées par macro-array (ou du moins une sélection représentative).

Le très faible nombre d'ESTs communes aux banques RO38 et MDF180 pourrait être dû à des mécanismes de résistance distincts, impliquant des gènes ou des cinétiques d'expression très différents. Il sera donc intéressant, lors de la validation de l'expression des EST par RT-qPCR, de poursuivre la comparaison de ces deux sources de résistance, cette fois avec la même souche et suivant une cinétique de prélèvement identique dans les 2 cas (de 6h à 10j).